

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
ANDRESSA PENEDO DE PAIVA ESTRELLA**

**Genômica Comparativa de Sorovares de *Leptospira interrogans* com Enfoque em
Putativos Fatores de Virulência e sRNAs Regulatórios**

Florianópolis

2018

ANDRESSA PENEDO DE PAIVA ESTRELLA

Genômica Comparativa de Sorovares de *Leptospira interrogans* com Enfoque em Putativos Fatores de Virulência e sRNAs Regulatórios

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina submetido como requisito para obtenção do Grau de Bacharela em Ciências Biológicas sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon.

Florianópolis

2018

Estrella, Andressa Penedo de Paiva
Genômica Comparativa de Sorovares de *Leptospira*
interrogans com Enfoque em Putativos Fatores de Virulência
e sRNAs Regulatórios / Andressa Penedo de Paiva Estrella ;
orientador, Ricardo Ruiz Mazzon, 2018.
96 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Microbiologia. 3. *Leptospira*
interrogans. 4. Regulação gênica. 5. Virulência. I. Mazzon,
Ricardo Ruiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Silvana Penedo, Carlos Eduardo Estrella e Carlos Felipe Estrella, por todo o apoio dado, permitindo-me estudar sem preocupações e concluir esta monografia, sem vocês sei que nenhuma parte da minhas graduação seria possível.

Ao meu orientador, professor Ricardo Ruiz Mazzon, primeiramente por ter me dado a oportunidade de participar do GeMBac e a possibilidade de eu conhecer uma área tão interessante e apaixonante da biologia. Também por todo carinho e atenção dados durante todo o meu percurso no laboratório, sempre disposto a elucidar cada uma das minhas dúvidas. Sendo também um orientador muito presente e um cientista incrível com muito conhecimento sobre a sua área, que eu realmente admiro.

Aos meus colegas de laboratório Bruno Dominski, Juliana Kmiecik, Maria Raitz, Gabriela Kuhl, Sayonara Tavares, e professora Fabienne Ferreira, assim como os colegas do laboratório iREG (Laboratório de Imunorregulação), Isis Mello e Gabriela Gubert, que contribuíram em muito para tornar maravilhoso todo o tempo que passei no laboratório. Principalmente a Bruno, Juliana, Maria e Sayonara, que fazem parte do “Fofocologia”, por serem simplesmente maravilhosos, e por todas as risadas, choros, reclamações, fofocas durante a autoclave, cafés e açaís durante a tarde, memes, e apoio. Eu definitivamente não teria conseguido terminar esse TCC sem vocês.

Aos meus amigos da turma 14.1, que entraram na UFSC comigo e compartilharam comigo as descobertas, dores e prazeres da universidade, mantendo-se unidos até o fim da graduação. Gostaria de fazer um agradecimento em especial a Duda Melo, Kathleen Yasmin, Bruno Tavares, Matheus D'avila, João Victor Krüger, e Thayza Melzer, por todo o companheirismo, risadas, festas, fofocas, discussões teóricas intermináveis, e apoio, tornando a graduação tão mais agradável e divertida

A todos os outros colegas, professores e amigos que eu conheci e me aproximei por causa da biologia, por terem participado e contribuído para o meu crescimento como estudante, como

futura bióloga e como pessoa. Em especial ao projeto de extensão Herbário FLOR e as pessoas maravilhosas que o compõe, este projeto de extensão me deu inúmeras oportunidades de aprendizado e de ajudar a manter uma estrutura de tamanha importância como o Herbário FLOR.

Ao meus amigos “modcats” e “mothcats”, que são pessoas incríveis e de uma gentileza ímpar, sempre prontos para oferecer palavras de consolação para cada desabafo meu. Em especial à Charlotte Kanzler, que me ajudou a entender como realizar a filogenia presente neste trabalho e me apresentou a ferramenta utilizada para os alinhamentos, assim como sempre foi uma ótima amiga, sempre disposta a ouvir minhas reclamações e frustrações quando algo não dava certo no laboratório, e sempre disposta a me mandar memes referentes a nossas áreas de estudos, que nunca falharam em alegrar meu dia.

Aos laboratórios de Protozoologia (PROTO), de Imunobiologia (LIDI), de Virologia Aplicada (LVA), Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA), que me ajudaram na minha formação dentro do laboratório, assim como disponibilizaram espaço e equipamentos para quaisquer necessidades para realização de experimentos, sendo sempre simpáticos e cordiais.

Ao CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa de Iniciação Científica.

EPÍGRAFE

“Libertas quae sera tamen.”

Públio Virgílio Maro, 19 a.c..

RESUMO

Leptospira interrogans é uma espiroqueta e uma das bactérias causadoras da leptospirose, uma doença de muita importância devido a sua distribuição mundial. Sendo o sorovar Copenhageni o principal causador de leptospirose humana no Brasil. A capacidade de *L. interrogans* evadir o sistema imune está intimamente associada à presença de fatores de virulência. Apesar de sua imensa importância, pouco se sabe sobre os mecanismos de regulação da expressão gênica de fatores de virulência. Existem descritos 11 pequenos RNAs não codificantes no genoma de uma linhagem desta bactéria e análises preliminares indicaram dois destes elementos como candidatos a serem pequenos RNAs regulatórios não codificantes que poderiam regular termolisinas, sem descartar a possibilidade de regularem outros fatores de virulência. Este trabalho propõe analisar, através de uma abordagem genômica, a possibilidade de diferentes sorovares de *L. interrogans* compartilharem os mesmos genes associados a mecanismos de virulência e regulação gênica destes fatores de virulência. Não foi possível realizar correlações entre sorovares e distribuição de fatores de virulência por todos possuírem os 27 fatores de virulência analisados, sendo possível fazer algumas inferências em relação a similaridade das sequências nucleotídicas para os fatores de virulência e a patogênese e virulência das linhagens. É possível que sv. Manilae isolado L495 compartilhe de mecanismos de regulação de fatores de virulência homólogos aos de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, o que levanta a possibilidade de outros sv. possuírem estes também. É possível que os sRNAs LIC1nc30, sRNA_30_251 e sRNA_37_187 regulem diversas proteínas relacionadas a possíveis fatores de virulência, principalmente de modo traducional negativo. Incluindo quatro proteínas hipotéticas que podem estar associadas à virulência. Foi possível também caracterizar as estruturas mais prováveis para os sRNAs analisados. O método MLST utilizando oito *loci* não parece ser ideal para filogenia a nível de sorovar e linhagem. Ainda são necessários muitos estudos para elucidar como se dá o transcriptoma dos sv. de *L. interrogans* para que seja possível fazer maiores

inferências. Por se tratar de um estudo *in silico*, é necessário ainda estudos *in vivo* e *in vitro* para a confirmação das possibilidades aqui levantadas.

Palavras chave: Fator de Virulência. Regulação gênica. Pequeno RNA.

ABSTRACT

Leptospira interrogans is a spirochaeta and one of the bacteria responsible for leptospirosis, a disease of extreme importance because of its global distribution. The serovar Copenhageni being the principal pathogen causing human leptospirosis on Brazil. *L. interrogans*'s capacity of evading the immune system is intimate linked to the presence of virulence factors. Besides its immense importance, little is known about the regulation mechanisms of the genic expression of virulence factors. There are 11 non-coding small RNAs described on the genome of a strain of this bacteria, and preliminary analysis pointed two of those elements as candidates to be regulatory non-coding small RNAs that may regulate thermolysins, without discarding the possibility of regulation of other virulence factors. This project proposes analyse, using a genomic approach, the possibility of different serovars of *L. interrogans* to share the same genes associate to virulence mechanisms and regulation of those virulence factors. It wasn't possible to correlate virulence factors' distribution and serovars as all strains had the 27 virulence factors analyzed, being possible to make inferences in relation of similarity of nucleotide sequences for each virulence factor and strains' virulence and pathogenesis. It's possible that sv. Manilae isolate L495 share virulence factors regulation mechanisms homologue to sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, which opens the possibility of this mechanism be shared with other serovars. It's possible that the sRNAs LIC1nc30, sRNA_30_251 e sRNA_37_187 regulate diverse proteínas related to possible virulence factors, especially in a negative tradutional way. Including four hypothetical proteins that may be associated with virulence. It was possible to also characterize the possible structural conformation of the sRNAs analyzed The MLST method utilizing eight *loci* seems to not be ideal for serovar and strain phylogeny. It's still necessary many studies to elucidate the transcriptome of *L. interrogans*' sv. to be possible to make more inferences. As this is a *in silico* study, it's necessary yet *in vivo* and *in vitro* studies to confirm any possibility rouse here.

Key-words: Virulence Factor. Genic regulation. Small RNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia do gênero <i>Leptospira</i> , incluindo a classificação de três grupos	20
Figura 2 - <i>Leptospira interrogans</i> em microscópio eletrônico de transmissão	21
Figura 3 - Pareamento entre LIC1nc30 e possível forma alternativa de LIC1nc30 de sv. Canicola str. DU114.....	43
Figura 4 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>ligA</i> nos diversos sorovares.....	49
Figura 5 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>ligB</i> nos diversos sorovares.....	49
Figura 6 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>ligC</i> nos diversos sorovares.....	50
Figura 7 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>rfbA</i> nos diversos sorovares.....	52
Figura 8 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>rfbB</i> nos diversos sorovares.....	52
Figura 9 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>rfbC</i> nos diversos sorovares.....	53
Figura 10 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>rfbD</i> nos diversos sorovares.....	53
Figura 11 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências de genes codificantes para putativas esfingomielina fosfodiesterase hemolisina homóloga a codificada por LIC_12631 nos diversos sorovares.....	55
Figura 12 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>sphH</i> nos diversos sorovares.....	56
Figura 13 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de <i>colA</i> nos diversos	

sorovares.....	57
Figura 14 - Estrutura mais provável do sRNA LIC1nc30.....	59
Figura 15 - Estrutura mais provável do sRNA LIC1nc50.....	60
Figura 16 - Estrutura mais provável do sRNA de sv. Canicola str. DU114 semelhante a LIC1nc30.....	61
Figura 17 - Pareamento entre o mRNA codificante para a putativa hemolisina esfingomielina fosfodiesterase LIC_12632 e LIC1nc30.....	63
Figura 18 - Pareamento entre o mRNA codificado por <i>rfbC</i> e LIC1nc30.....	64
Figura 19 - Pareamento entre o mRNA codificante para o putativo LigB e LIC1nc30.....	64
Figura 20 - Pareamento entre o mRNA codificante para o putativo LigA e LIC1nc30.....	65
Figura 21 - Pareamento entre o mRNA codificante para a putativa Peroxirredoxina e LIC1nc30.....	65
Figura 22 - Pareamento entre o mRNA codificado por <i>rfbB</i> e LIC1nc50.....	66
Figura 23 - Pareamento entre o mRNA codificante para a putativa Peroxirredoxina e LIC1nc50.....	66
Figura 24 - Pareamento entre sRNA_30_251 de sv. Manilae isolado L495 e termolisina homóloga a LIC13322, assim como a estrutura de sRNA_30_251	69
Figura 25 - Pareamento entre sRNA_37_187 de sv. Manilae isolado L495 e termolisina homóloga a LIC13320	70
Figura 26 - Árvore filogenética de sorovares de <i>L. interrogans</i>	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Linhagens selecionados para as análises com código de acesso, estágio de sequenciamento e origem.	34
Quadro 2 - Genes utilizados para a montagem da árvore filogenética.....	40
Quadro 3 - Principais hospedeiros de cada sorovar de <i>L. interrogans</i>	41
Quadro 4 - Presença de sequência homóloga a LIC1nc30, LIC1nc50, LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322.....	42
Quadro 5 - Genes para fatores de virulência selecionados para o presente estudo com suas respectivas referências.....	44
Quadro 6 - Presença dos Genes de alguns dos fatores de virulência selecionados em cada sorovar de <i>L. interrogans</i> , assim como um sorovar de <i>L. biflexa</i>	46
Quadro 7 - Possíveis Alvos de Regulação de LIC1nc30.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST - Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamentos Locais (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

TCDB – Banco de dados de classificação de transporte (do inglês, *Transport Classification Database*)

KEGG - Enciclopédia Kyoto de genes e genomas (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LPS - Lipopolissacarídeo(s)

MLST - Tipagem com sequência *multilocus* (do inglês, *multilocus sequence typing*)

MUSCLE - Comparação de múltiplas sequências por expectativa de log (do inglês, *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*)

Phyre2 - Ferramenta de reconhecimento de homologia/analogia de proteína (do inglês, *Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0*)

RBS - Sítio de Ligação do Ribossomo (do inglês, *Ribosome Binding Site*)

RNA - Ácido ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

rRNA - RNA ribossomal (do inglês, *ribosomal RNA*)

SMART – Ferramenta de pesquisa de arquitetura modular simples (do inglês, *Simple Modular Architecture Research Tool*)

sRNA - Pequeno RNA (do inglês, *small RNA*)

Str. - Linhagem (do inglês, *strain*)

Sv. - Sorovar(es)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 A BACTÉRIA <i>Leptospira interrogans</i>	19
1.2 A DOENÇA LEPTOSPIROSE.....	21
1.3 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS.....	27
1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA E PEQUENOS RNAS REGULATÓRIOS.....	28
1.5 JUSTIFICATIVA.....	30
1.6 OBJETIVOS.....	30
1.6.1 Objetivo Geral	31
1.6.2 Objetivos Específicos	31
2 METODOLOGIA	33
2.1 SELEÇÃO DE SOROVARES DE <i>Leptospira</i> sp. A SEREM ANALISADOS	33
2.2 ANÁLISE DA PRESENÇA DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS A LIC1nc30, LIC1nc50, LIC10715, LIC13320, LIC13321, E LIC13322 EM DIVERSOS SV. DE <i>L. interrogans</i>	35

2.3 ANÁLISE DA PRESENÇA DE GENES CODIFICANTES PARA OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA EM DIVERSOS SV. DE <i>L. interrogans</i>	36
2.4 BUSCA DE POSSÍVEIS ALVOS DOS sRNAs LIC1nc30 E LIC1nc50 EM <i>L. interrogans</i> sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130.....	36
2.5 CARACTERIZAÇÃO DE POSSÍVEIS CONFORMAÇÕES ESTRUTURAIS DOS sRNAs.....	37
2.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE <i>L. interrogans</i> sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130.....	38
2.7 ANÁLISE DE sRNAs DOS SOROVARES.....	38
2.8 MONTAGEM DE ÁRVORE FILOGENÉTICA PARA OS SV. DE <i>L. interrogans</i>	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1 SELEÇÃO DE SOROVARES.....	40
3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA E PEQUENOS RNAs	41
3.3 ESTRUTURA DOS sRNAs	58
3.4 OUTROS ALVOS DE LIC1nc30 E LIC1nc50	62

3.5 ANÁLISE DOS GENES PUTATIVAMENTE REGULADOS POR LIC1nc30	66
3.6 ANÁLISE DE sRNAs DOS SOROVARES.....	68
3.7 ÁRVORE FILOGENÉTICA	71
4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	75
4.1 CONCLUSÃO	75
4.2 PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	77

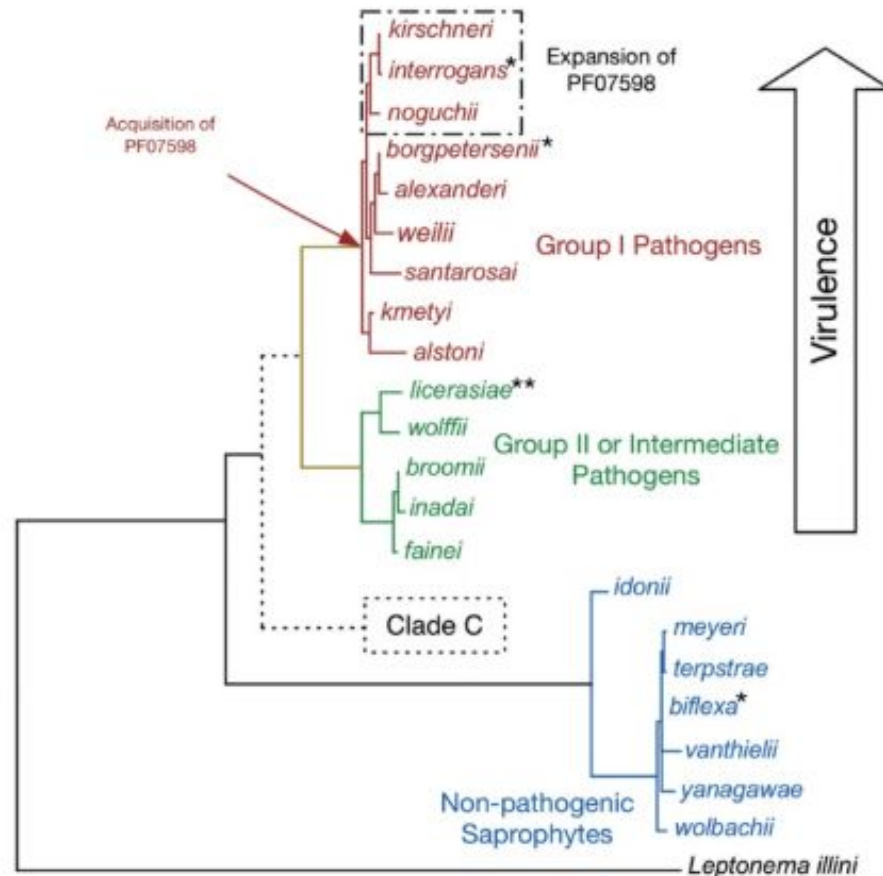
1 INTRODUÇÃO

1.1 A BACTÉRIA *Leptospira interrogans*

A ordem *Spirochaetales* está presente dentro da classe *Spirochaetia*, que faz parte do filo *Spirochaetes* (FAINE et al., 1999). Essa classe é dividida em quatro famílias: *Spirochaetaceae*, *Brachyspiraceae*, *Brevinemataceae* e *Leptospiraceae*, sendo esta última a qual o gênero *Leptospira* está incluso (PASTER, 2015). A classe possui representantes patogênicos em diversas ordens como *Leptospiriales*, que contém o gênero *Leptospira*; *Brachyspiriales*, que contém *Brachyspira* spp., causadora de diarreia em suínos; *Spirochaetales*, que contém a bactéria *Treponema pallidum*, causadora da sífilis, e *Borrelia* spp., causadora da doença de Lyme (GUPTA; MAHMOOD; ADEOLU, 2013).

O gênero *Leptospira* compreende bactérias gram-negativas, que podem ser saprófitas, como *L. biflexa*, ou patogênicas, como *L. interrogans* (PASTER, 1991), alvo deste projeto. Alguns autores também incluem um terceiro grupo intermediário (Fig. 1), que não possui uma patogenicidade clara, e compreende as seguintes espécies: *Leptospira inadai*, *Leptospira broomii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira wolffii* e *Leptospira licerasiae* (BOURHY et al., 2014).

Figura 1 - Taxonomia do gênero *Leptospira*, incluindo a classificação de três grupos.



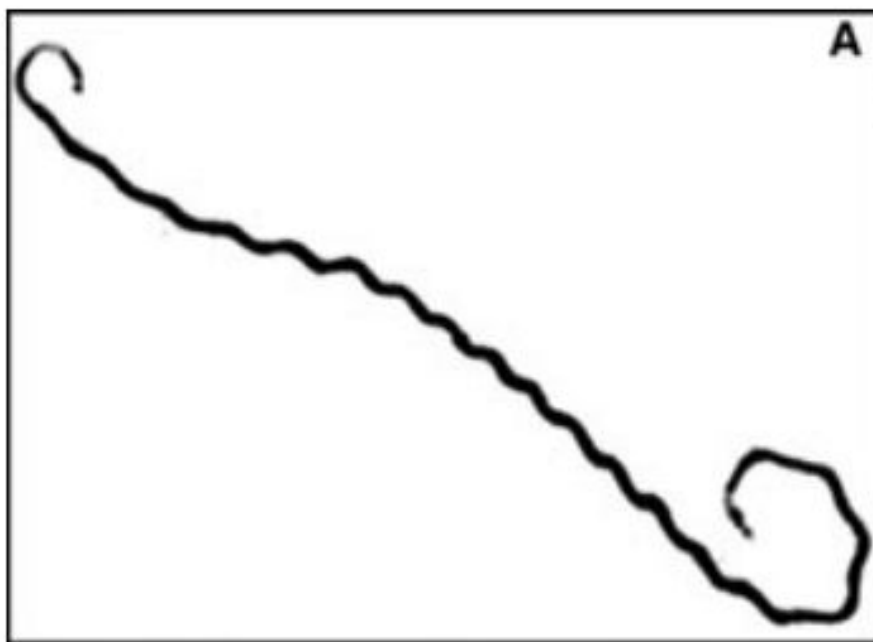
Fonte: LEHMANN et al., 2014. A figura separa as espécies do gênero *Leptospira* em três grupos: Grupo 1, de leptospiros patogênicas, representado em vermelho; Grupo 2, de leptospira de patogenia intermediária, representado em verde; e o grupo das leptospira não-patogênicas ou saprofíticas, representado em azul. A seta demonstra para onde a patogenicidade cresce.

Historicamente, antes de 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies: *L. biflexa*, que compreendia todas as espécies saprofíticas do gênero, isoladas do ambiente, e *L. interrogans*, que compreendia todas as espécies patogênicas (JOHNSON, 1996), sendo esta classificação baseada principalmente em características fenotípicas (LEVETT, 2001). Com a

substituição por uma classificação genotípica e o estudo de diversas linhagens deste gênero, foram definidas diversas espécies (LEVETT, 2001), até a chegada na classificação atual. Atualmente há 24 espécies dentro do gênero *Leptospira*, sendo dez dessas espécies capazes de causar leptospirose em humanos e outros animais (PICARDEAU, 2017).

As bactérias do gênero *Leptospira* são aeróbias obrigatórias que crescem lentamente, possuindo uma temperatura ótima de crescimento entre 28 e 30°C (SILVA, 2017), além de muitas delas possuírem uma característica morfológica marcante: suas extremidades terminam em forma de gancho (Fig. 2), aparentando formar um ponto de interrogação (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Leptospiras possuem cerca de 0,25 µm de diâmetro e entre 6 e 25 µm de comprimento, sendo, portanto, capazes de passar por filtros de 0,45 µm (BHARTI et al., 2003). A *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, em específico, possui dois cromossomos circulares, um grande contendo 4.277.185 pares de base, e um menor contendo 350.181 pares de base (NASCIMENTO et al., 2004).

Figura 2 - *Leptospira interrogans* em microscópio eletrônico de transmissão.



Fonte: Fraga, Barbosa e Isaac (2011)

1.2 A DOENÇA LEPTOSPIROSE

A infecção por leptospirosas pode apresentar-se de formas muito variadas, desde uma infecção com sinais subclínicos até uma doença febril indiferenciada, mas também pode apresentar quadros sistêmicos mais graves e menos frequentes. Por causa de sua ampla variação de sintomas, a leptospirose pode ser confundida com outras doenças como malária e dengue, sendo necessário levar em consideração a leptospirose como diagnóstico diferencial (LEVETT, 2003). Sendo assim, o diagnóstico dessa doença é comumente não confirmado (LEVETT et al., 2001).

Esses casos mais graves de leptospirose, que envolviam febre, aumento do fígado e do baço, hemorragias e icterícia, foram identificados por Weil, em 1886, recebendo o nome de síndrome de Weil (apud DAVIDSON et al., 1934). Tendo, como a apresentação clássica da doença, sintomas como icterícia, hemorragia e falha aguda dos rins, com a síndrome de hemorragia pulmonar severa sendo uma complicação proeminente (GOUVEIA et al., 2008).

Em 1915, Inada et al. descreveu o agente causador da leptospirose, assim como sua associação com ratos e outros animais como reservatórios e via de transmissão da doença a humanos. A leptospirose aloja-se nos rins do animal reservatório, sendo excretada juntamente com a urina, a transmissão então se dá quando humanos entram em contato com essa urina, seja diretamente, ou de modo indireto: através de materiais, solo e água contaminados (WILSON, 1966). Dependendo de condições ambientais favoráveis, leptospirosas podem viver até meses no ambiente (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

Leptospirose é uma doença que pode ser encontrada em quase todos os continentes, excluindo apenas Antártida, sendo a zoonose mais disseminada no mundo todo (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Sendo ainda endêmica em regiões tropicais e subtropicais (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Os principais grupos de risco afetados pela leptospirose são compostos por grupos associados ao contato com reservatórios da doença ou locais contaminados por estes, que incluem moradores de favelas, atletas de esportes aquáticos, pessoas que participam de atividades recreacionais aquáticas, militares e trabalhadores

de esgotos (COSTA et al., 2015; MORGAN et al., 2002; AGAMPODI et al., 2013; KATZ et al., 2002).

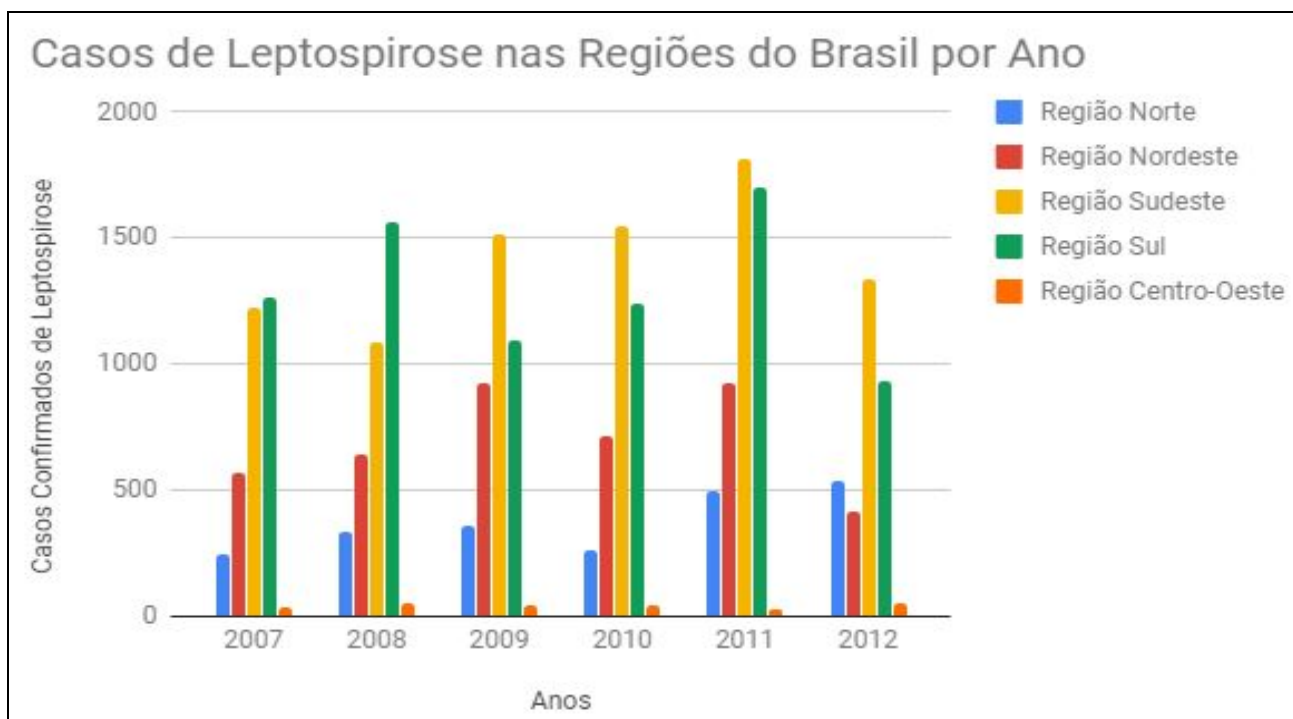
Estima-se que 10 ou mais a cada 100.000 pessoas sejam diagnosticadas com leptospirose em regiões tropicais por ano (GENEVA, 2018). Sendo a estimativa para o mundo como um todo 500.000 pessoas diagnosticadas por ano (ABELA-RIDDER; SIKKEMA; HARTSKEERL, 2010).

Essa doença ainda assim possui uma prevalência maior nos trópicos, onde sua transmissão acaba por ser mais favorável, já que leptospirosas patogênicas são capazes de sobreviver por mais tempo em ambientes que sejam quentes e úmidos (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Porém sua transmissão ocorre tanto em países industrializados quanto países em desenvolvimento (BHARTI et al., 2003), havendo uma incidência sazonal, com o pico nos trópicos ocorrendo junto com a estação chuvosa (LEHMANN et al., 2014).

De acordo com a Portaria número 204 do Ministério da Saúde (2016), a leptospirose é uma doença de notificação compulsória e imediata no Brasil. Sendo que a região sul do Brasil costuma possuir o maior número absoluto de casos de leptospirose no país (BLAZIUS, 2005).

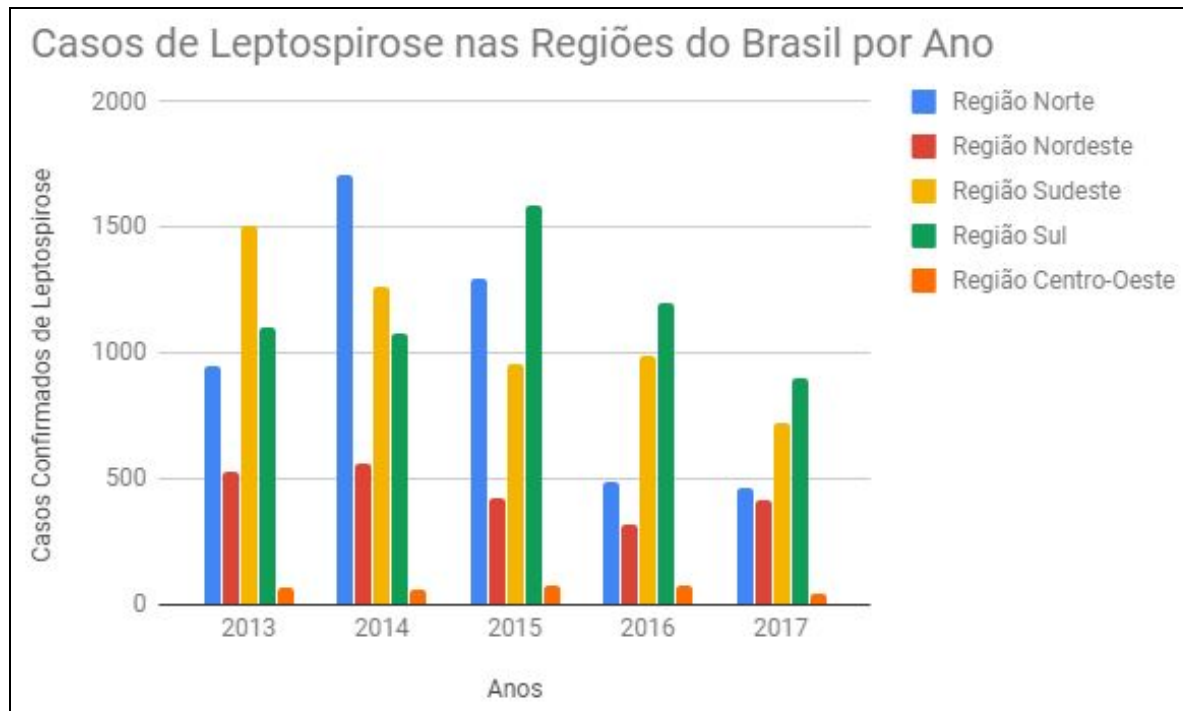
Houve um total de 41.798 casos confirmados de leptospirose entre 2007 e 2017, sendo 13.654 casos na região sul, com a maior parte dos casos (5.189 casos) na região sul provenientes de Santa Catarina (DATASUS, 2018). Tornando assim Santa Catarina o estado com o segundo maior número de casos totais confirmados de leptospirose entre 2007 e 2017. Nos gráficos 1 e 2, há uma comparação entre as regiões do Brasil dos casos confirmados de leptospirose por ano, com a região Sul e Sudeste possuindo os maiores números de casos na maioria dos anos (dos 10 anos contabilizados, a região Sul lidera em 5 destes anos, e a região Sudeste em 6 deles), com a região Sul assumindo a liderança nos últimos 3 anos. No gráfico 3, há uma comparação entre os estados da região Sul do país quanto aos casos de leptospirose por 100 mil habitantes por ano, podendo notar que Santa Catarina lidera o número de casos em todos os anos apresentados.

Gráfico 1. Casos de leptospirose nas regiões do Brasil por ano.



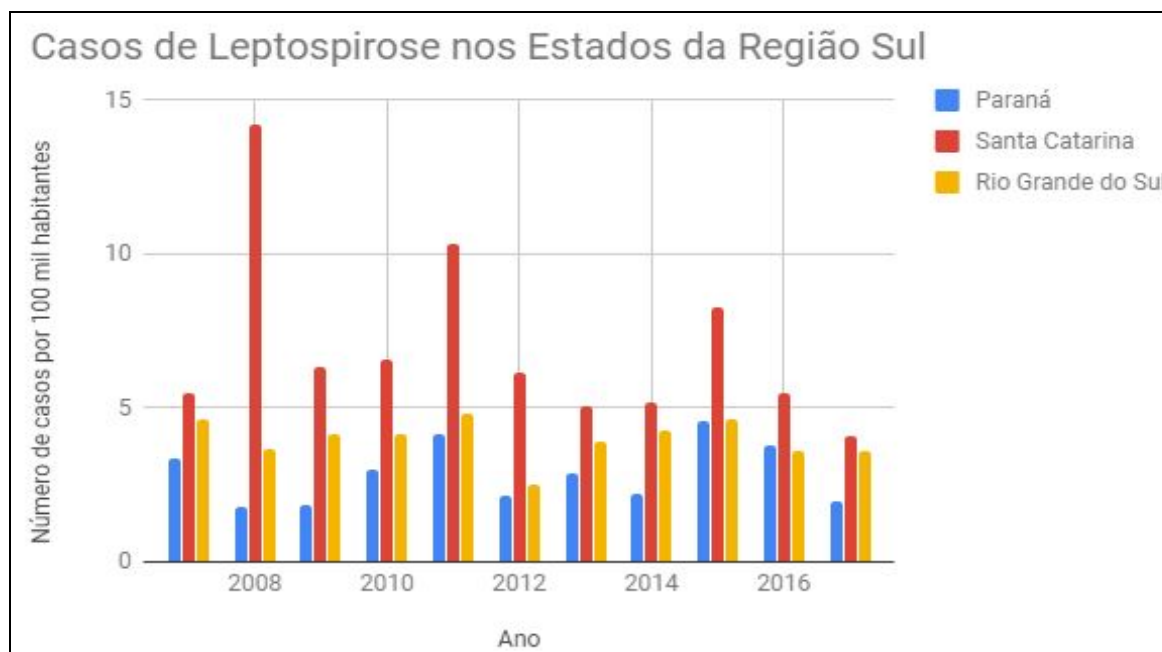
Fonte: DATASUS, 2018

Gráfico 2. Casos de leptospirose nas regiões do Brasil por ano.



Fonte: DATASUS, 2018

Gráfico 3. Casos de leptospirose nos estados da região sul do Brasil por 100 mil habitantes por ano.



Fonte: DATASUS, 2018

Devido a todas as complicações para o reconhecimento da doença, é possível que os casos de leptospirose em humanos sejam subnotificados, havendo uma incidência real maior do que aquela registrada (SILVA, 2017).

A leptospirose também é de suma importância para a pecuária, já que pode afetar bovinos, suínos e ovinos. Causando diversos problemas, que se traduzem em perda financeira de pecuaristas, como distúrbios reprodutivos, principalmente abortos, mastite atípica com queda na produção de leite, insuficiência hepática e renal, icterícia e febre (LANGONI, 1999).

Apesar da importância do combate a essa doença, ainda não existe uma vacina potente e efetiva sendo comercializada, as vacinas que foram desenvolvidas não são capazes de oferecer proteção contra outros sorovares além dos utilizados para fazer a vacina, assim como não induzem memória imunológica, tornando necessário reforços anuais (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011). O gênero *Leptospira* apresenta aproximadamente 300 sorovares (sv) causadores

da leptospirose (COSATE et al., 2017), o que torna inviável a produção de uma vacina que abranja todos os sorovares patogênicos (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011).

O sorovar Copenhageni é o maior causador de leptospirose humana, possuindo uma alta mortalidade (ADLER et al., 2011). Esses sorovares são classificados a partir de uma análise da heterogeneidade estrutural no componente carboidrato do lipopolissacarídeo presente na membrana externa da bactéria (BOURHY et al., 2014). Apesar da divisão em sorovares não possuir de fato uma base taxonômica (JOHNSON, 1996), a análise dos sorovares possui uma imensa importância epidemiológica, tendo em vista que provê informações quanto aos possíveis hospedeiros reservatórios envolvidos nessa transmissão (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Sendo ainda esses sorovares, em geral, adaptados para hospedeiros mamíferos específicos, podendo cada sorovar ser adaptado a mais de um hospedeiro (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

1.3 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS

O sistema complemento de seres humanos é capaz de reconhecer e destruir microorganismos, possuindo três vias de ativação que garantem o reconhecimento de patógenos (FRAGA et al., 2013). Em resposta a esta pressão dos hospedeiros, patógenos evoluíram famílias de fatores de virulência, proteínas e outros agentes que são importantes para a capacidade deste patógeno infectar seu hospedeiro, incluindo fatores que favorecem invasão, crescimento e reprodução dentro do hospedeiro, através da evasão das defesas imunológicas do hospedeiro, assim como a aquisição de recursos provenientes do hospedeiro (ARMSTRONG, 2006).

De acordo com Fraga, Isaac e Barbosa (2016), uma das vias de ação do sistema complemento é a via alternativa, que inicia com a hidrólise espontânea de uma cadeia presente no elemento C3. Na ativação do sistema complemento, são gerados fragmentos C3b e C4b, que podem então se ligar covalentemente a superfícies propícias, como células invasoras localizadas perto do local de ativação. E nessas superfícies, formam-se convertases C3 e C5, que mais tarde irão desencadear a formação do complexo de ataque de membrana, que culminará na lise do microorganismo. Também, a opsonização com C3b e C4b torna mais eficiente a internalização

dos microorganismos por neutrófilos, monocitos e macrófagos (FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016). Com isso, o elemento C3 é considerado um componente chave do sistema complemento de vertebrados (ARMSTRONG, 2006), assim como a molécula central da via alternativa (RICKLIN et al., 2010).

Os mecanismos de virulência em leptospiros são pouco conhecidos, principalmente por uma limitação metodológica, já que por muito tempo houve uma falta de ferramentas para manipulação genética eficientes para leptospiros patogênicos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). O crescimento lento e a falta de um plasmídeo de ocorrência natural em leptospiros patogênicos também dificultou o desenvolvimento deste tipo de ferramenta (EVANGELISTA; COBURN, 2010). Pappas, Benaroudj e Picardeau (2015) facilitaram a manipulação genética de leptospiros patogênicos através da criação do vetor plasmidial pMaORI, capaz de replicar-se em leptospiros saprófitas, intermediárias e patogênicas, expandindo o horizonte de possibilidades de estudos utilizando manipulação genética de leptospiros.

1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA E PEQUENOS RNAs REGULATÓRIOS

L. interrogans, assim como outras leptospiros patogênicas, são capazes de inibir algumas vias associadas ao sistema imune de seres humanos, em especial a via alternativa, através de certas metaloproteases, chamadas termolisinas, que clivam componentes do sistema complemento, como o elemento C3, possibilitando assim que a bactéria evada o sistema imune (AMAMURA et al., 2017; FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016). Termolisinas fazem parte da classe das proteases, uma importante classe de fatores de virulência, que pode agir auxiliando na evasão do sistema imune, nutrição e reprodução do patógeno (ARMSTRONG, 2006). A família das termolisinas é exclusiva de leptospiros patogênicos, sendo estas termolisinas codificadas por diversos genes independentes (FRAGA et al., 2013), mas pouco se sabe sobre sua regulação.

Picardeau *et al.* (2008), ao fazer comparações do genoma de leptospiros patogênicos e saprófitas, identificou 1431 genes presentes em pelo menos uma leptospira patogênica e ausente em leptospiros saprófitas, ou seja, possíveis genes que codificam fatores de virulência. Dentro destes, genes que codificam termolisinas; HtpG, que é homólogo à chaperona Hsp90 de

eucariotos (KING et al., 2013) e pensa-se que age em seus substratos de modo a promover pequenas mudanças conformacionais possibilitando manter a atividade de seu substrato (PEARL; PRODROMOU, 2006); chaperona DnaK, GrpE, GroEL e ClpB, que estão associadas com resistência a estresse térmico e virulência (LO et al., 2009; LOURDAULT et al., 2011); além de diversos outros genes.

Caimano et al. (2014) comparou a expressão gênica de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni *in vitro* e adaptada ao hospedeiro, identificando 110 genes que possuem regulação positiva apenas *in vivo* e que podem, portanto, configurar-se como fatores de virulência, sendo que 11 destes genes não codificam proteínas, apesar de serem ativamente transcritos, tornando-os candidatos a serem pequenos RNAs (ácido ribonucleico, na sigla em inglês) regulatórios (sRNAs). Destes 11 sRNAs, 7 tiveram funções putativas identificadas, enquanto os 4 restantes, incluindo LIC1nc30 e LIC1nc50, ainda não tiveram funções identificadas (CAIMANO et al., 2014).

RNAs regulatórios em bactérias compõem um grupo heterogêneo que possuem diversos mecanismos capazes de regular um espectro amplo de respostas fisiológicas (WATERS; STORZ, 2009). Esses RNAs regulatórios podem agir de diversas formas, atuando na modulação da transcrição e da tradução, na estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) e na manutenção ou silenciamento do DNA (Ácido desoxirribonucleico, na sigla em inglês), assim como podem utilizar diferentes mecanismos para tal, entre eles interações com o DNA, pareamento com outros RNAs e mudanças na conformação do RNA (WATERS; STORZ, 2009).

Entre eles, estão os sRNAs trans-codificados de pareamento de bases, que costumam ter uma complementaridade limitada com o mRNA alvo e usualmente pareiam com o sítio de ligação do ribossomo (RBS, na sigla em inglês) do mRNA, ocluindo-o, o que geralmente leva a uma repressão da produção das proteínas através da degradação do mRNA, da inibição da tradução ou de ambos (WATERS; STORZ, 2009). Está cada vez mais aparente a importância de pequenos RNAs como reguladores (STORZ; ALTUVIA; WASSARMAN, 2005), havendo diversos exemplos de RNAs regulando fatores de virulência. Como o plasmídeo de virulência pJM1 de *Vibrio anguillarum*, onde o RNA β sRNA reduz a expressão de certos fatores de virulência pela terminação da transcrição de seus genes (STORK et al., 2007), e a CsrB família

de sRNAs em *Salmonella*, *Erwinia*, *Yersinia*, *Vibrio*, e *Pseudomonads*, que regulam negativamente proteínas que são reguladoras globais de genes de virulência nesses organismos (HEROVEN et al., 2008).

Pensando-se nisso e utilizando-se a ferramenta IntaRNA, foi feita uma comparação *in silico* entre as sequências dos sRNAs e as sequências das termolisinas, visando averiguar se haveria uma sobreposição entre as sequências desses sRNAs e os sítios regulatórios dessas termolisinas (MAZZON, dados não publicados). Desta forma, foi possível verificar complementaridade entre as sequências de LIC1nc30 ou LIC1nc50 com putativos mRNAs das quatro termolisinas: LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 (na nova anotação chamadas de LIC_RS03685, LIC_RS17090, LIC_RS17095, LIC_RS17100, respectivamente), complementaridade essa que ocupa a região correspondente a RBS dos genes dessas termolisinas, indicando um possível papel dos sRNAs regulando negativamente essas termolisinas, mas não é possível descartar que outros mecanismos regulatórios possam estar presentes mediados por esses sRNAs e não evidenciados pela análise *in silico*. *L. interrogans* possui dois cromossomos circulares (CABELLO; SARTAKOVA; DOBRIKOVA, 2001), sendo que todos os genes aqui citados localizam-se no cromossomo 1.

1.5 JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, há poucas informações acerca da regulação gênica de termolisinas em leptospiros patogênicas, mesmo havendo fortes indícios do papel importante dessas proteínas na infecção por leptospiros (AMAMURA et al., 2017). Os pequenos RNAs regulatórios codificados por LIC1nc30 e LIC1nc50 são possíveis candidatos para possuir papel na regulação de termolisinas, sendo que a análise de como ocorre a expressão gênica de fatores de virulência é uma ferramenta que pode ser muito útil para elucidar características epidemiológicas de doenças (STRAUSS; FALKOW, 1997), como a leptospirose, uma doença com distribuição tão ampla e de tamanha importância, principalmente no estado de Santa Catarina.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo avaliar, através de uma abordagem genômica, a possibilidade de diferentes sorovares de *L. interrogans* compartilharem os mesmos mecanismos de virulência e regulação gênica destes fatores de virulência.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Analisar a presença, conservação e similaridade dos sRNAs LIC1nc30 e LIC1nc50, e das termolisinas LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322 nos diferentes sv. de *L. interrogans*;
- Identificar possíveis genes de virulência já descritos na literatura científica para *L. interrogans* e analisar sua presença nos diferentes sv. da espécie;
- Diferenciar os diferentes sv. De *L. interrogans* através da montagem de uma árvore filogenética, usando como base marcadores já descritos para *L. interrogans*;
- Buscar por outros possíveis alvos dos sRNAs LIC1nc30 e LIC1nc50 em *L. interrogans* sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130 com enfoque em fatores de virulência. Também caracterizar proteínas hipotéticas encontradas através desta busca.
- Caracterizar possíveis conformações estruturais de LIC1nc30 e LIC1nc50, assim como de quaisquer formas alternativas destes.

2 METODOLOGIA

2.1 SELEÇÃO DE SOROVARES DE *Leptospira* sp. A SEREM ANALISADOS

Utilizando o banco de dados *GenBank* do NCBI (BENSON et al., 2012), averiguou-se quais sorovares e linhagens estavam depositados no banco de dados e selecionou-se os espécimes que possuíam seu genoma completo ou pelo menos um cromossomo depositados. Foram encontradas 9 linhagens completamente sequenciadas (Sv. Bratislava str. PigK151, sv. Copenhageni str. FDA-ARGOS 203, sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, sv. Hardjo str. Norma, sv. Lai str. 56601, sv. Lai str. IPAV, Sv. Linhai str. 56609, Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP, Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP) e 6 com pelo menos um cromossomo sequenciado (Sv. Canicola str. DU114, sv. Canicola str. RUFN, sv. Copenhageni/Icterohaemorrhagiae str. Piscina, Sv. Hardjo-prajitno str. Hardjoprajitno, Sv. Manilae isolado L495, Sv. RCA), como é possível ver no Quadro 1. Foi também escolhida uma linhagem da bactéria saprófita *L. biflexa* como um controle negativo.

Quadro 1 - Linhagens selecionados para as análises com código de acesso, estágio de sequenciamento e origem.

Sorovar/Linhagem	Código de Acesso	Estágio de Sequenciamento	Origem (Local)	Origem (Hospedeiro)
Bratislava str. PigK151	NZ_CP011410	Completamente sequenciado	Iowa, USA	Porco
Canicola str. DU114	CP022883	Parcialmente sequenciado	Brasil	Humano
Canicola str. RUFN	CP022885	Parcialmente sequenciado	Fernando de Noronha, Brasil	Rato
Copenhageni str. FDA-ARGOS 203	NZ_CP020414	Completamente sequenciado	EUA	Humano
Copenhageni str. Fiocruz L1-130	NC_005823	Completamente sequenciado	Salvador, Brasil	Humano
Copenhageni/Icterohaemorrhagiae str. Piscina	NZ_CP018146	Parcialmente sequenciado	Sul do Brasil	Humano
Hardjo str. Norma	NZ_CP012603	Completamente sequenciado	Minas Gerais, Brasil	Gado
Hardjo-prajitno str. Hardjoprajitno	NZ_CP013147	Parcialmente sequenciado	Indonésia	Humano

Lai str. 56601	NC_004342	Completamente sequenciado	Pequin, China	Humano
Lai str. IPAV	NC_017551	Completamente sequenciado	China	Humano
Linhai str. 56609	NZ_CP006723	Completamente sequenciado	Linhai, China	Humano
Manilae isolado L495	NZ_LT962963	Parcialmente sequenciado	Filipinas	Humano
Manilae str. UP-MMC-NIID HP	NZ_CP011934	Completamente sequenciado	Filipinas	Humano
Manilae str. UP-MMC-NIID LP	NZ_CP011931	Completamente sequenciado	Filipinas	Humano
RCA	CP022538	Parcialmente sequenciado	Brasil	Cachorro
<i>L. biflexa</i> sv. Patoc str. Patoc I (Paris)	NC_010602.1	Completamente sequenciado	Paris, França	Ambiente
<i>L. borgpetersenii</i> sv. Hardjo-bovis str. L550	NC_008508.1	Completamente sequenciado	Austrália	Não disponível

Fonte: Genbank

2.2 ANÁLISE DA PRESENÇA DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS A LIC1nc30, LIC1nc50, LIC10715, LIC13320, LIC13321, E LIC13322 EM DIVERSOS SV. DE *L. interrogans*

Através das sequências já conhecidas e anotadas dos genes codificantes de dois RNAs possivelmente regulatórios (LIC1nc30, localização no genoma entre 849.634 e 849.900, e LIC1nc50, localização no genoma entre 2.109.156 e 2.109.444) e das quatro termolisinas (LIC10715/LIC_RS03685, LIC13320/LIC_RS17090, LIC13321/LIC_RS17095, e LIC13322/LIC_RS17100) já descritas para *Leptospira interrogans* sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, foi utilizado a ferram BLAST (*B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool; ALTSCHUL et al., 1990) para comparar cada uma dessas sequências com os genomas disponíveis no banco de dados *GenBank* para o sorovares escolhidos. Tendo em vista identificar genes possivelmente equivalentes aos do sorovar Copenhageni em outros sorovares.

2.3 ANÁLISE DA PRESENÇA DE GENES CODIFICANTES PARA OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA EM DIVERSOS SV. DE *L. interrogans*

A partir de fatores de virulência já descritos na literatura científica para *L. interrogans*, procurou-se no banco de dados *GenBank* a presença de anotações para cada um destes genes em cada um dos sorovares escolhidos. Na ausência de anotações para estes genes, foi feito um BLAST entre as sequências destes fatores de virulência, provenientes em geral do sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, e o genoma dessas linhagens, para garantir que elas de fato não possuem a sequência deste gene para fator de virulência, ao invés de apenas uma ausência de anotação. Após isso, foi feito um alinhamento utilizando a ferramenta MUSCLE - *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (EDGAR, 2004), e a partir da árvore filogenética disponibilizada pelo programa, analisou-se a relação entre a similaridade dos fatores de virulência dentre as linhagens e sorovares de *L. interrogans* e a associação destes com a virulência e patogênese destas linhagens.

2.4 BUSCA DE POSSÍVEIS ALVOS DOS sRNAs LIC1nc30 E LIC1nc50 EM *L. interrogans* sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130

Por meio da utilização da ferramenta IntaRNA (MANN; WRIGHT; BACKOFEN, 2017), foi realizada uma busca por possíveis pareamentos entre os pequenos RNAs LIC1nc30 e LIC1nc50 com o genoma de *L. interrogans* sv. Copenhageni L1-130, tendo como parâmetros que o pareamento pudesse ocorrer entre os sRNAs e a região compreendida entre 150 nucleotídeos antes do códon de início de tradução da fase aberta de leitura até 50 nucleotídeos depois deste mesmo códon.

A partir desses dados, por meio da utilização da plataforma KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KANEHISA et al., 2018), a sequência nucleotídica dos genes apontados na análise do IntaRNA foram obtidas, especialmente aquelas correspondentes aos possíveis sítios de hibridação com os sRNAs (150 nucleotídeos antes e 50 nucleotídeos depois do códon de início de tradução da fase aberta de leitura), para que então, utilizando-se a ferramenta BLAST, ser possível comparar essa sequência com os dados de RNAseq de Caimano e colaboradores (2014), de modo a se identificar se estas sequências, onde pode haver este pareamento com os sRNAs, são transcritas para mRNA e poderiam de fato serem alvos de uma regulação pós-transcricional e/ou traducional. Tendo em vista a limitação da ferramenta em questão quando usada contra um genoma por inteiro, onde apenas são apresentados os 100 pareamentos considerados mais prováveis, além de privilegiar pareamentos mais longos, foi feito também o pareamento entre cada fator de virulência escolhido, utilizando os mesmos parâmetros anteriores de 150 nucleotídeos antes e 50 depois do códon de início de tradução da fase aberta de leitura dos fatores de virulência em questão.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DE POSSÍVEIS CONFORMAÇÕES ESTRUTURAIS DOS sRNAs

Utilizando-se a ferramenta Mfold (ZUKER, 2003), procurou-se as mais prováveis conformações estruturais dos sRNAs LIC1nc30 e LIC1nc50. A partir da estrutura mais provável, escolhida aquela que resultava em um menor gasto de energia, comparou-se as porções das sequências dos sRNAs que ficariam livres em alças com as porções dos sRNAs que possivelmente pareiam com proteínas para identificar uma possível regulação *in trans*.

2.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE *L. interrogans* sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130

A partir dos dados das análises com IntaRNA e Mfold, aquelas sequências consideradas possíveis de serem reguladas pelos sRNAs e que estavam anotadas no genoma como gene codificante para proteínas hipotéticas foram analisadas por meio da utilização das ferramentas Phyre2 - *Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0* (KELLEY et al., 2015), SMART – *Simple Modular Architecture Research Tool* (LETUNIC; BORK, 2017), I-TASSER *Protein Structure and Function Predictions* (YANG et al., 2015) e dos bancos de dados TCDB – *Transport Classification Database* (SAIER et al., 2015) e Pfam (FINN et al., 2016), para identificar uma possível função dessas proteínas.

2.7 ANÁLISE DE sRNAs EQUIVALENTES A LIC1nc30 E LIC1nc50 DOS SOROVARES

Usando os dados disponibilizados por Zhukova e colaboradores (2017) quanto aos sRNAs encontrados em *L. interrogans* sv. Manilae isolado L495, procurou-se algum que pudesse ter uma sequência equivalente a LIC1nc30 ou LIC1nc50. Aqueles que equivaliam pelo menos parcialmente a esses sRNAs foram analisados através da ferramenta IntaRNA contra as sequências de 150 nucleotídeos antes e 50 depois do códon de início da fase aberta de leitura das termolisinas, para verificar se haveria uma manutenção do pareamento, podendo indicar assim uma possível manutenção de função regulatória. Foi feito o mesmo também para quaisquer formas alternativas dos sRNAs LICnc30 e LIC1nc50.

2.8 MONTAGEM DE ÁRVORE FILOGENÉTICA PARA OS SV. DE *L. interrogans*

Os genes usualmente utilizados no método MLST (*multilocus sequence typing*) descritos para leptospiros patogênicas (BOONSLIP et al., 2013; VARNI et al., 2014; AHMED et al., 2006) encontram-se descritos no banco de dados PubMLST - *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity* (JOLLEY; BRAY; MAIDEN, 2018) foram concatenados em um

único arquivo multifasta e submetidos a alinhamento usando a ferramenta MUSCLE. O quadro 2 mostra os genes utilizados. A partir deste arquivo multifasta, utilizou-se a ferramenta MEGA7 – *Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 7.0* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) para se montar uma árvore filogenética, com os seguintes parâmetros: método Maximum Likelihood, teste Bootstrap Method 1000 replicações.

Quadro 2 - Genes utilizados para a montagem da árvore filogenética.

Gene	Produto Putativo	Tamanho do Gene (pb)
<i>adk</i>	Adenilato Cinase	531-557
<i>icdA</i>	Isocitrato Desidrogenase	674
<i>lipL32</i>	Lipoproteína L32	474
<i>lipL41</i>	Lipoproteína L41	520
<i>glmU</i>	UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase	650
<i>pntA</i>	NAD(P) trans-hidrogenase subunidade alfa	621
<i>mreA</i>	Proteína RodA determinante de forma de haste	719
<i>rrs2</i>	RNA ribossomal 16s	541
<i>secY</i>	Pré-proteína Translocase subunidade SecY	549

Fonte: NALAM, 2018

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DE SOROVARES

Através de busca na literatura científica, pode-se encontrar os principais hospedeiros de cada um destes sorovares (Quadro 3), de modo a melhor caracterizar as linhagens.

Quadro 3 - Principais hospedeiros de cada sorovar de *L. interrogans*.

Sorovar	Hospedeiros						
	Humanos	Bois	Cavalos	Cachorros	Ovelhas	Roedores	Porcos
Sv. Bratislava str. PigK151	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Canicola str. DU114	✓	□	✓	✓	□	✓	✓
Sv. Canicola str. RUFN	✓	□	✓	✓	□	✓	✓
Sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203	✓	□	✓	✓	□	✓	□
Sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130	✓	□	✓	✓	□	✓	□
Sv. Copenhageni/Icterohaemorrhagiae str. Piscina	✓	□	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Hardjo str. Norma	✓	✓	✓	□	✓	✓	□
Sv. Hardjo-prajitno str. Hardjoprajitno	✓	✓	✓	□	✓	✓	□
Sv. Lai str. 5660	✓	□	□	□	□	✓	□
Sv. Lai str. IPAV	✓	□	□	□	□	✓	□
Sv. Linhai str. 56609	✓	□	□	□	□	✓	□
Sv. Manilae isolate L495	✓	□	□	□	□	✓	□
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP	✓	□	□	□	□	✓	□
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP	✓	□	□	□	□	✓	□
Sv. RCA	□	□	□	✓	□	✓	□
<i>Leptospira biflexa</i> serovar Patoc strain 'Patoc 1 (Paris)'	□	□	□	□	□	□	□

Fonte: Bharti et al. (2003); Llanes, Restrepo e Rajeev (2016); Romero et al. (1994); Blazius et al. (2005); Lilenbaum (1998); Löffler et al. (2014); Moreno et al. (2018); ADLER et al. (2011).

3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA E PEQUENOS RNAS

No quadro 4, é possível ver que a análise com BLAST mostrou que os genes para os pequenos RNAs não codificantes (LIC1nc30 e LC1nc50) e para as termolisinas (LIC13320, LIC13321, LIC13322, e LIC10715) estão todos presentes, com acima de 90% de similaridade com as sequências conhecidas, em 11 das linhagens analisadas (73,3%). LIC1nc30, LIC10715 e LIC13322 estão presentes, com acima de 90% de similaridade, em 13 das linhagens (86,7%), enquanto LIC1nc50, LIC13320 e LIC13321 estão presentes em todas as linhagens (100%).

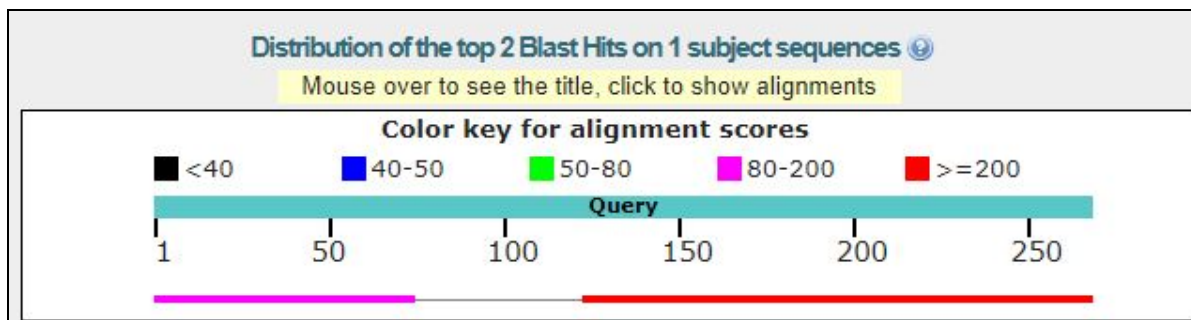
Quadro 4 - Presença de sequência homóloga a LIC1nc30, LIC1nc50, LIC10715, LIC13320, LIC13321 e LIC13322.

Sorovar/Genes	LIC1nc30	LIC1nc50	LIC13320	LIC13321	LIC13322	LIC10715
Sv. Bratislava str. PigK151	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Canicola str. DU114	*	✓	✓	✓	✓	□
Sv. Canicola str. RUFN	□	✓	✓	✓	✓	□
Sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Copenhageni/Icterohaemorrhagiae str. Piscina	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Hardjo str. Norma	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Hardjo-prajitno str. Hardjoprajitno	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Lai str. 5660	✓	✓	✓	✓	*	✓
Sv. Lai str. IPAV	✓	✓	✓	✓	*	✓
Sv. Linhai str. 56609	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Manilae isolate L495	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. RCA	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Leptospira biflexa</i> serovar Patoc strain 'Patoc 1 (Paris)'	□	□	□	□	□	□

Fonte: BLAST. A *checkbox* em verde indica presença de uma única cópia do gene, o quadrado em vermelho indica ausência do gene, * indica presença de uma possível forma modificada do gene, e um triângulo amarelo na ponta superior direita da célula indica a presença de duas cópias do gene. Com fundo verde estão as análises do sorovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130, que foi um controle positivo, e com fundo vermelho *L. biflexa* sv. Patoc str. Patoc 1 (Paris), que foi usada como controle negativo.

Sv. Canicola str. DU114 apresenta uma possível forma alternativa de LICnc30, possuindo uma deleção de 95 nucleotídeos (Fig. 3). Do mesmo modo, sv. Lai str. 56601 e sv. Lai str. IPAV apresentaram uma possível forma alternativa de LIC13322, havendo uma similaridade entre essas sequências e LIC13322 de 88%, e esta diferença não parece afetar o sítio catalítico, descrito por Fraga (2014), destas termolisinas. Sendo que estas possíveis formas alternativas presentes em linhagens de sv. Lai são iguais entre si (100% de similaridade). Sv. Canicola str. RUFN não possui nenhum gene equivalente a LIC1nc30 e LIC10715, enquanto Sv. Canicola str. DU114 não possui apenas LIC10715.

Figura 3 - Pareamento entre LIC1nc30 e possível forma alternativa de LIC1nc30 de sv. Canicola str. DU114.



Fonte: BLAST. Em rosa e vermelho estão demonstradas as sequências de sv. Canicola str. DU114 que possuem homologia a LIC1nc30, sendo entre elas os 95 nucleotídeos da sequência de LIC1nc30 que não possuem homologia a nenhuma sequência de sv. Canicola str. DU114.

A deleção presente em LIC1nc30 de sv. Canicola str. DU114 não é devido ao sequenciamento parcial da linhagem. E esta deleção parece afetar a funcionalidade do sRNA possivelmente expresso por ela, tendo em vista que essa deleção causa uma perda de pareamento entre o sRNA e as termolisinas. Mais sobre isso será tratado nos tópicos seguintes.

Essa forma alternativa da termolisina LIC13322 das linhagens do sv. Lai não tira a capacidade da linhagem de ser patogênica, tendo em vista que sv. Lai str. 56601 é uma linhagem patogênica e bem virulenta (ZHONG et al., 2011). Não se sabe se esta modificação afeta a funcionalidade da termolisina, porém, mesmo que afete a funcionalidade, a perda de uma das termolisinas pode não afetar a virulência da bactéria pela presença das outras termolisinas suprirem a função da termolisina não funcional.

Todas as linhagens de *L. interrogans* analisadas são patogênicas, fazendo com que seja de extrema importância para a bactéria a presença de pelo menos um gene codificante de termolisina, uma proteína de tamanha importância como fator de virulência e capaz de clivar o componente C3 do sistema complemento (AMAMURA et al., 2017; FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016).

A presença de sequência para LIC1nc50 em todas as linhagens indica uma forte conservação desta sequência, e pode indicar um possível papel regulatório importante dentro das linhagens. Do mesmo modo, a conservação de LIC1nc30 na maioria das linhagens, excluindo

apenas as linhagens do sv. Canicola, também pode indicar um papel regulatório de um gene importante para estas linhagens. Sendo que a ausência de genes homólogos a estes em *L. biflexa*, uma espécie saprofítica, pode indicar um possível papel regulatório em genes de virulência

No quadro 5, encontram-se os genes de virulência escolhidos para análise, com suas respectivas referências. Foram selecionados um total de 27 genes codificantes para fatores de virulência. A partir das análises, encontrou-se que todos os genes estão presentes em todas as linhagens patogênicas de *L. interrogans*, sendo ainda cinco destes genes também encontrados em *L. biflexa* (Quadro 6).

Quadro 5 - Genes para fatores de virulência selecionados para o presente estudo com suas respectivas referências.

Produto gênico ou fator de virulência	Referências
Proteína da família MCE (<i>mammalian cell entry</i>)	Zhang et al. (2012); Fraser e Brown (2017)
MviN	Ling et al. (2006); Bouchet et al. (2003); Adhikarla et al. (2018); Jadhav et al. (2014)
Proteína LptD de montagem de LPS (lipopolissacarídeo)	Grassmann, Souza e McBride (2017); Grassmann et al. (2017)
Hemolisinas (<i>hlyX</i> /LIC_10325; III; LIC_11040; esfingomielina fosfodiesterase/LIC_12632; esfingomielina fosfodiesterase/LIC_12631; <i>sphH</i> ; <i>tlyB</i> /hemolisina B)	Fraser e Brown (2017); Lee (2002); Trowbridge et al. (1981); Kasarov (1970)
Fator de montagem de proteína de membrana externa	Cullen (2002)
Rfb loci (<i>rfaA</i> ; <i>rfaB</i> ; <i>rfaC</i> ; <i>rfaD</i>)	COSATE et al. (2017)

LenA	Verma et al. (2010); Fraser e Brown (2017)
LigA; LigB; LigC	Matsunaga et al. (2003); Koizumi e Watanabe (2004); Palaniappan et al. (2006); Choy et al. (2007); Fraser e Brown (2017)
LipL32	Cullen (2002); Zeng et al. (2015); Fraser e Brown (2017); Guerreiro et al. (2001)
Flagelina	Lin, Bughio e Surujballi (1999); Evangelista e Coburn (2010)
HtpG	King et al. (2013)
ClpB	Zeng et al. (2015); Lourdault et al. (2011)
Colagenase (<i>colA</i>)	Janwitthayanan et al. (2013); Kassegne et al. (2013)
Proteína chaperona Hsp70 (<i>dnaK</i>)	Guerreiro et al. (2001); Ballard et al. (1998)
Peroxirredoxina	Hofmann, Hecht e Flohé (2002); Arias et al. (2014); Sakolvaree et al. (2007)
LipL45	Zeng et al. (2015); Vijayachari et al. (2015); Fraser e Brown (2017); Artiushin et al. (2004); Guerreiro et al. (2001)

Fonte: Autora.

Quadro 6 - Presença dos Genes de alguns dos fatores de virulência selecionados em cada sorovar de *L. interrogans*, assim como um sorovar de *L. biflexa*.

Sorovar/Genes	Proteína da família MCE (mammalian cell entry)	Proteína LptD de assembleia de LPS	Fator de assembleia de proteína de membrana externa	ligA	Flagelina
Sv. Bratislava str. PigK151	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Canicola str. DU114	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Canicola str. RUFN	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Copenhageni/Icterohaemorrhagiae str. Piscina	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Hardjo str. Norma	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Hardjo-prajitno str. Hardjoprajitno	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Lai str. 56601	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Lai str. IPAV	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Linhai str. 56609	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Manilae isolate L495	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP	✓	✓	✓	✓	✓
Sv. RCA	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Leptospira biflexa</i> serovar Patoc strain 'Patoc 1 (Paris)'	✓	✓	✓	✓	✓

Fonte: GenBank, editado pela autora.

De fato há pouca variação entre os sorovares de *L. interrogans*, o que era de se esperar, tendo em vista que estes fazem parte da mesma espécie. Isso pode, portanto, significar que há mais fatores de virulência do que os abordados pelo presente estudo e que estes apresentam uma variação entre sorovares, ou ainda então que as diferenças entre o grau de virulência de cada linhagem se dá possivelmente por diferenças de expressão dos fatores de virulência, já que os genes para estes estão presentes em todas as linhagens. Sendo então, de qualquer modo, necessários mais estudos quanto ao padrão de expressão destes genes nestas linhagens.

A proteína da família MCE, a proteína LptD de montagem de LPS, o fator de montagem de proteína de membrana externa e a flagelina, que parecem ter uma função também estrutural, não apenas relacionados à virulência, aparecem também na espécie saprofítica, mas o que não exclui o papel deles na virulência de *L. interrogans*. Contudo, o fato de haver sequências homólogas a genes para fatores de virulência não significa necessariamente uma expressão destes fatores de virulência, como parece ser o caso de proteínas da família MCE. Apesar de *L. biflexa* possuir a sequência para este fator de virulência, já foi determinado que esta proteína não é

expressa nesta espécie nas condições testadas (ZHANG et al., 2012), o que pode também acontecer com LigA, que está presente em *L. biflexa*.

Estruturas expostas na superfície da bactéria são presumivelmente os fatores que mediam a adesão da leptospira às células do hospedeiro, sendo que, assim como outras espiroquetas, leptospiros possuem diversas lipoproteínas, que podem então estarem envolvidas na mediação das interações com a célula hospedeira (MATSUNAGA et al., 2003). A matriz extracelular do hospedeiro, que inclui colágeno, laminina, fibronectina e fibrinogênio, pode servir como substrato tanto para adesão do patógeno às células do hospedeiro como também para a fixação dos microrganismos colonizantes (PATTI et al., 1994). Já é bem caracterizado que tanto adesão quanto colonização do tecido do hospedeiro pelo patógeno é um evento de suma importância e que ocorre cedo no processo de infecção (BARBOSA et al., 2006).

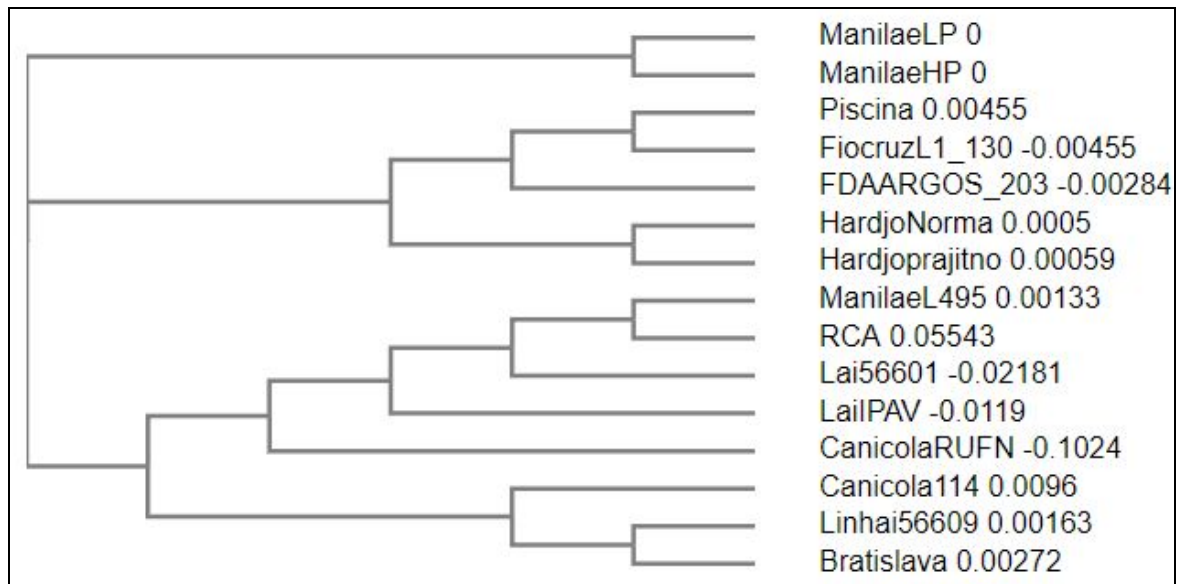
Os fatores de virulência LigA, LigB e LigC são de extrema importância para interações entre patógeno e hospedeiro (MCBRIDE et al., 2009), sendo capazes de ligarem com diversas proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, incluindo fibronectina, colágenos, laminina e elastina, assim como possivelmente participando de diversos estágios da infecção (CHOY et al., 2007). Essas proteínas podem também estar associadas à especificidade do sorovares a seus hospedeiros principais, assim como a evasão do sistema imune (KOIZUMI; WATANABE, 2004). LigA e LigB também demonstram homologia a proteínas de ligação celular de outras bactérias, como *Yersinia* spp. e *Clostridium* spp. (PALANIAPPAN et al., 2006). Sendo que esta proteína de ligação celular de *Yersinia* spp. já demonstrou possuir capacidade de clivar o componente C3 do sistema complemento (SODEINDE et al., 1992).

LigB parece apenas ser expressa *in vivo*, sendo tanto LigA quanto LigB possíveis candidatos a antígenos para vacinas contra leptospiros patogênicos (KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; CHOY et al., 2007). A perda de LigA e LigB já foi associada à perda da capacidade de produzir uma infecção letal em hamsters (MATSUNAGA et al., 2003). É possível que LigC seja na verdade um pseudogene (MATSUNAGA et al., 2003).

Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP derivam de uma mesma linhagem, com uma sendo depois de diversas passagens em meio de cultura em laboratório e, portanto, avirulenta (sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP), enquanto a outra, depois

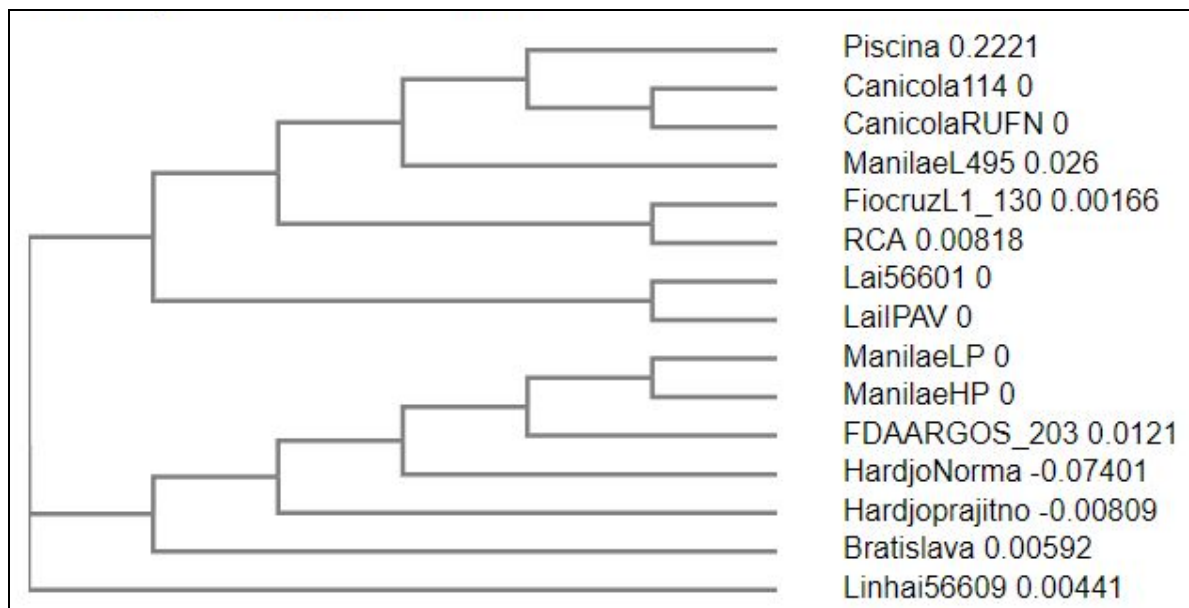
de poucas passagens (sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP) (SATOUE et al., 2015), justificando assim a sua similaridade de sequência nucleotídica para os putativos *ligA* (Fig. 4), *ligB* (Fig. 5) e *ligC* (Fig.6). Há indícios de que as linhagens pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae ao redor do mundo sejam muito similares entre si (JAEGGER et al., 2018), justificando sua semelhança em *ligA*. Sv. Manilae isolado L495 e sv. Lai str. 56601 são linhagens bastante virulentas (YANAGIHARA et al., 2007; HUANG et al., 2014), o que poderia explicar a similaridade entre as linhagens em *ligA*, porém não se possui dados da virulência de str. RCA, não sendo possível se fazer maiores inferências neste caso. Sv. Hardjo-prajitno str. Hardjoprajitno e sv. Hardjo str. Norma apresentam cerca de 99,9% de semelhança entre suas sequências nucleotídicas (LLANES; RESTREPO; RAJEEV, 2016), justificando sua proximidade em *ligA* e *ligC*, porém não se há dados da virulência de sv. Hardjoprajitno str. Hardjo-prajitno (LLANES; RESTREPO; RAJEEV, 2016)

Figura 4 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *ligA* nos diversos sorovares.



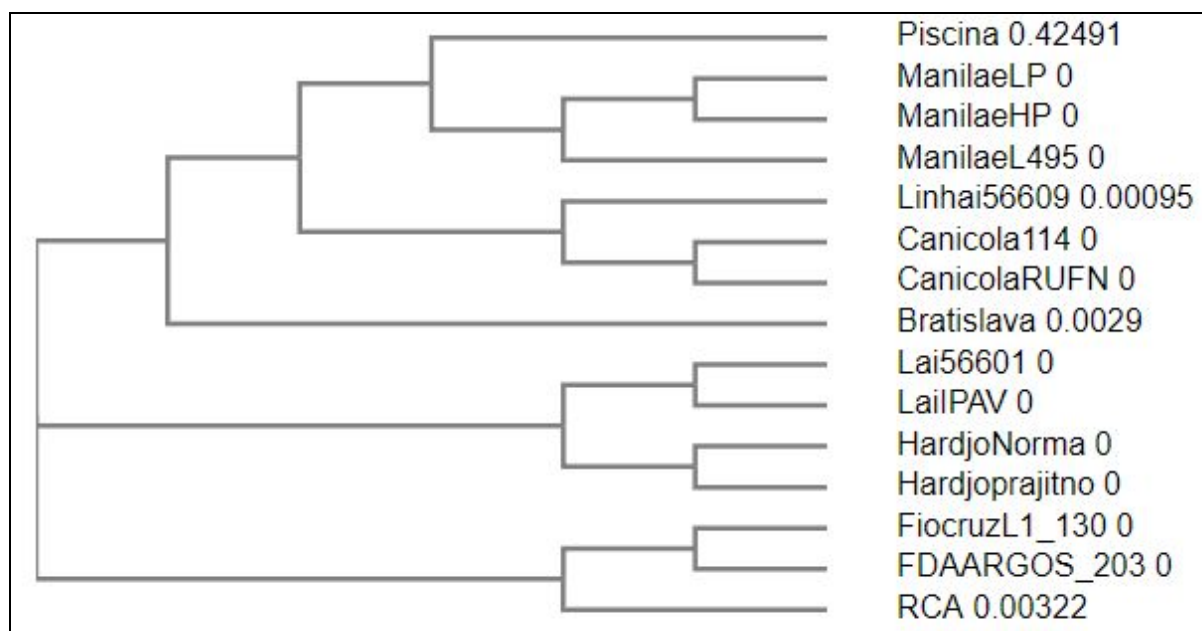
Fonte: MUSCLE.

Figura 5 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *ligB* nos diversos sorovares.



Fonte: MUSCLE.

Figura 6 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *ligC* nos diversos sorovares.



Fonte: MUSCLE.

LenA é uma proteína de superfície com múltiplas funções, envolvidas na adesão, evasão imune e invasão de tecidos do hospedeiro (VERMA et al., 2010; FRASER; BROWN, 2017). Para que a leptospira possa disseminar-se para diversos órgãos ao infectar um hospedeiro, é preciso que ela seja capaz de ultrapassar as barreiras impostas pelo tecido do hospedeiro, deste modo, essa proteína, que é capaz de se ligar ao plasminogênio do hospedeiro e ativá-lo, pode utilizá-lo para degradar estas barreiras no tecido do hospedeiro, principalmente a fibronectina (VERMA et al., 2010). LenA também já se mostrou ser mais expressa à 37°C, uma condição que imita a temperatura encontrada na infecção de um hospedeiro humano (FRASER; BROWN, 2017). A árvore de similaridade de *lenA*, assim como de outros genes, não estão mostradas neste trabalho em virtude de não haver o que discutir sobre elas.

A proteína LipL32 é considerada ser o antígeno protéico imunodominante em leptospiros, sendo também a proteína mais abundante na membrana externa de leptospiros (CULLEN, 2002). LipL32 talvez sofra de um processamento pós-transcricional, apesar de ser raro este tipo de processamento em proteína de superfície de bactérias resultando em mais de uma proteína

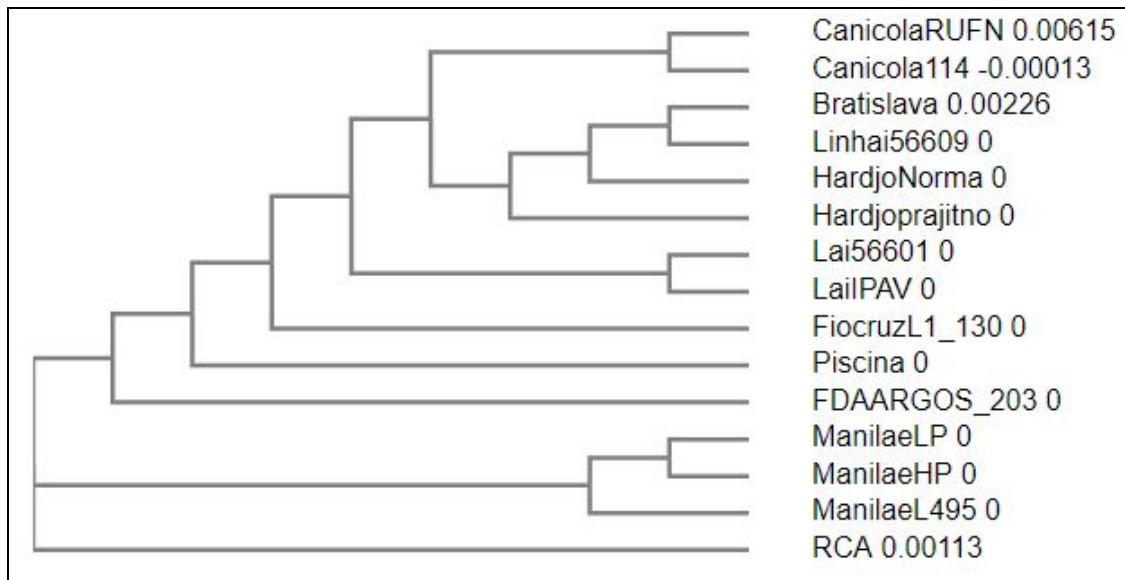
codificada por um único gene. Também, LipL32 já demonstrou facilitar a hemólise mediada pela esfingomielinase codificada por *sphH* (CULLEN, 2002).

Já foi demonstrado que a membrana externa de *L. interrogans* é constituída por pelo menos 67 unidades proteicas diferentes, sendo estas produtos de pelo menos 12 genes diferentes, o que ressalta a importância do fator de montagem de proteínas da membrana externa tanto para a sobrevivência da bactéria, quanto para sua possível patogênese (CULLEN, 2002).

As proteínas da família MCE estão associadas à adesão, que ocorre com a ligação da bactéria a integrinas, e à invasão da leptospira às células de seus hospedeiros principalmente durante os primeiros estágios da infecção, sendo ainda a falta deste gene associada a uma menor virulência da bactéria, devido a uma diminuição da capacidade de adesão e invasão (ZHANG et al., 2012; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

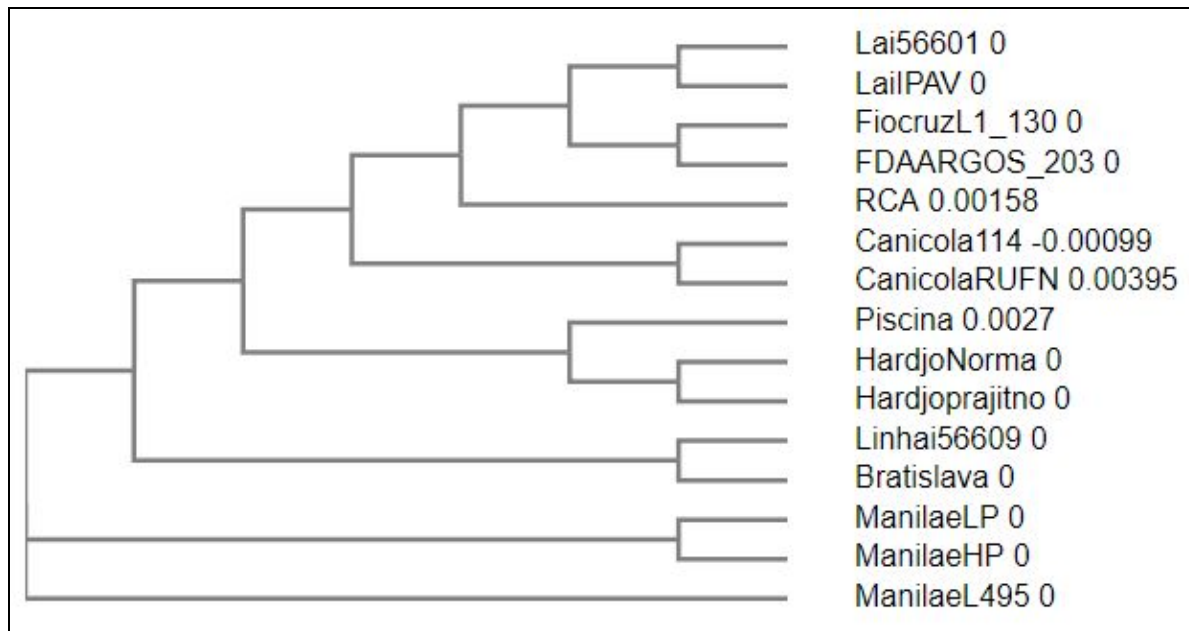
RfbA, RfbB, RfbC e RfbD contribuem para a biossíntese de LPS, em especial o antígeno-O, uma estrutura importante que determina o sorovar das leptospiros (PEÑA-MOCTEZUMA; BULACH; ADLER, 2001). Por isso, faz sentido que em todos os *loci* as linhagens pertencentes aos mesmos sorovares se agrupem (Fig. 7 à 10). Não foi definido um sorovar para str. RCA, sendo possível especular que esta linhagens faça parte do sv. Copenhageni, tendo em vista que esta linhagem fica próxima de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130 e sv. Copenhageni str. FDA-ARGOS 203 em *rfbB*, *rfbC* e *rfbD*.

Figura 7 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *rfbA* nos diversos sorovares.



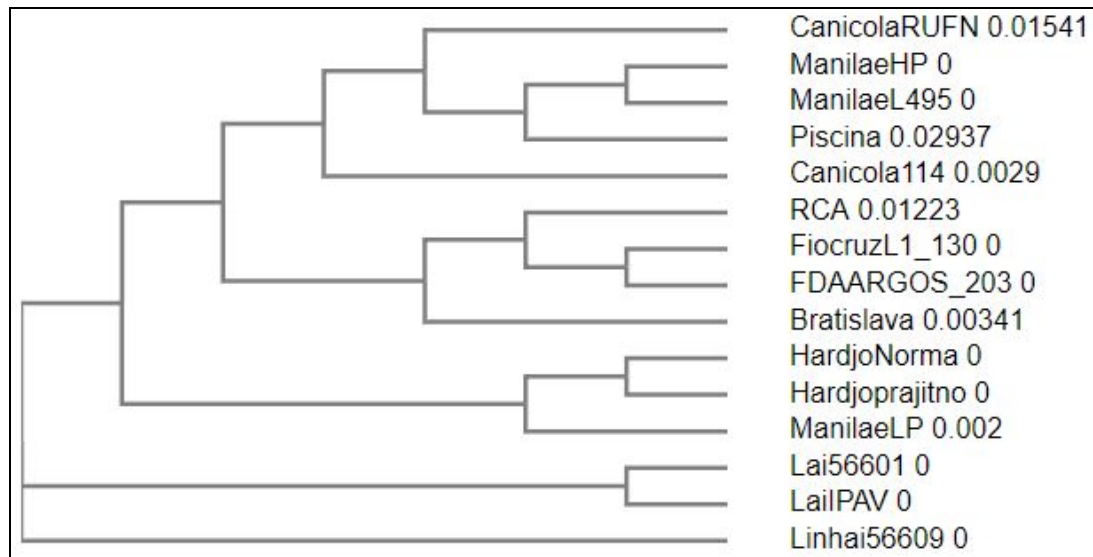
Fonte: MUSCLE.

Figura 8 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *rfbB* nos diversos sorovares.



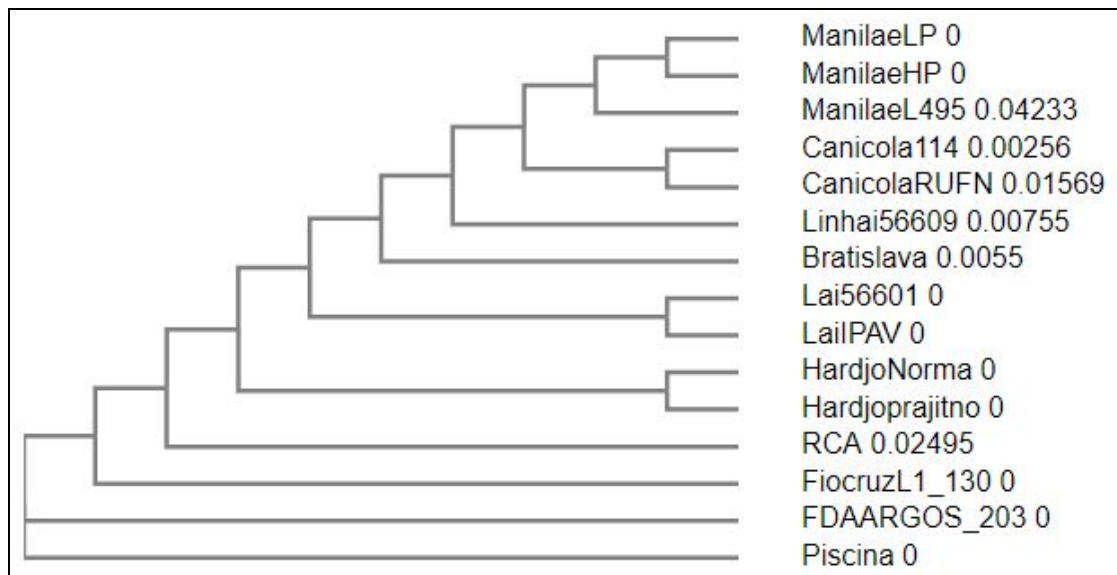
Fonte: MUSCLE.

Figura 9 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *rfbC* nos diversos sorovares.



Fonte: MUSCLE.

Figura 10 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *rfbD* nos diversos sorovares.



Fonte: MUSCLE.

ClpB é uma proteína de choque térmico, que já se demonstrou ser mais expressa em uma

temperatura de 37°C, similar a temperatura corporal humana, assim como há uma forte correlação entre sua presença na leptospira e um aumento da virulência (ZENG et al., 2015; LOURDAULT et al., 2011). Também se pensa que ClpB esteja de alguma forma relacionada com uma resposta geral a estresse, assim como há relatos de diminuição da virulência de leptospiros com perda de funcionalidade desta proteína (LOURDAULT et al., 2011).

HtpG parece ter uma função semelhante à ClpB, sendo importante para resposta a estresse da leptospira, principalmente em altas temperaturas e mudança de osmolaridade, com sua ausência também correlacionada com uma diminuição da virulência (KING et al., 2013). King e colaboradores (2013) também descreveram um possível papel de htpG auxiliando na mudança conformacional de proteínas.

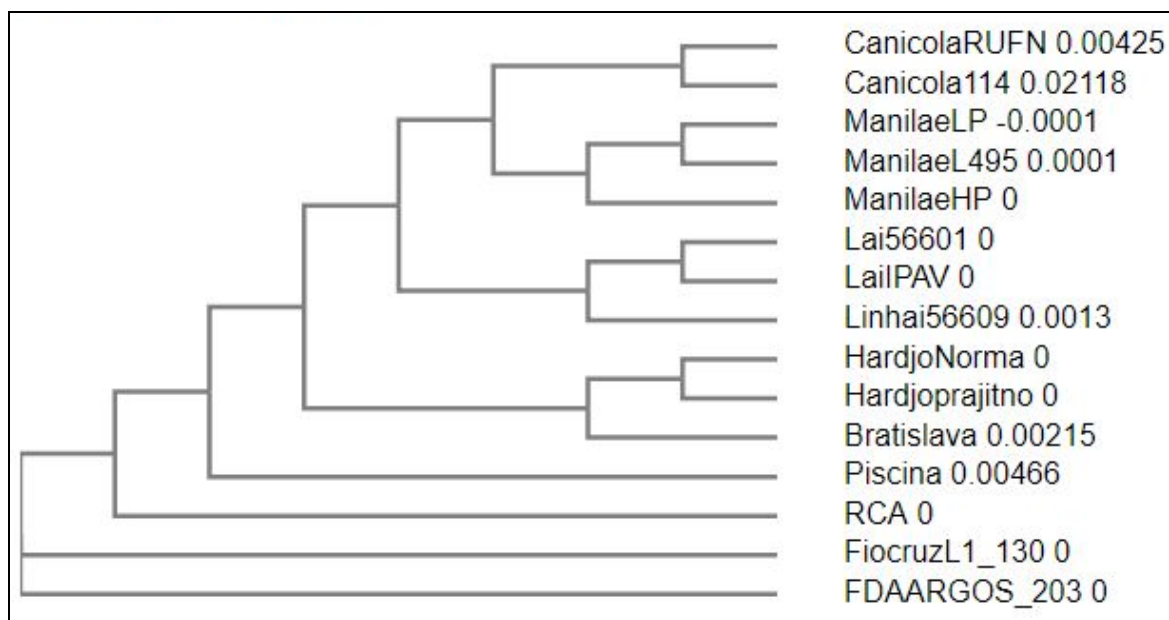
A proteína de superfície LipL45 somente é expressa em linhagens com poucas passagens (ZENG et al., 2015). Esta proteína é considerada uma porina (GUERREIRO et al., 2001). É considerada uma forte candidata como antígeno para vacinas contra leptospiros patogênicos (VIJAYACHARI et al., 2015).

DnaK é uma proteína chaperona de choque térmico, que já foi descrita como regulada positivamente em temperaturas correspondente a de hospedeiros de leptospiros (GUERREIRO et al., 2001). Esta proteína tem um papel crítico no reparo, dobramento e montagem de proteínas durante estresse térmico (BALLARD et al., 1998), como pode acontecer durante a infecção no hospedeiro.

A ação hemolítica de hemolisinas, que afetam diversas células de hospedeiros mamíferos, é importante para a patogênese das leptospiros (LEE, 2002), muitas delas agem por meio da degradação ocasionada pela esfingomielinase sobre eritrócitos (TROWBRIDGE et al., 1981; KASAROV, 1970). A hemolisina codificada por *sphH*, assim como outras hemolisinas, possui ação hemolítica, sendo que a hemólise causada por ela está associada à formação de poros na membrana da célula-alvo, ela também possui homologia com uma hemolisina de *L. borgpetersenii* (LEE et al., 2000). A criação de poros por hemolisinas permite a passagem de moléculas para dentro da célula afetada, e a alta concentração de macromoléculas dentro da célula gera uma pressão osmótica que causa entrada de água na célula e, conseqüentemente, a lise da célula (LEE, 2002).

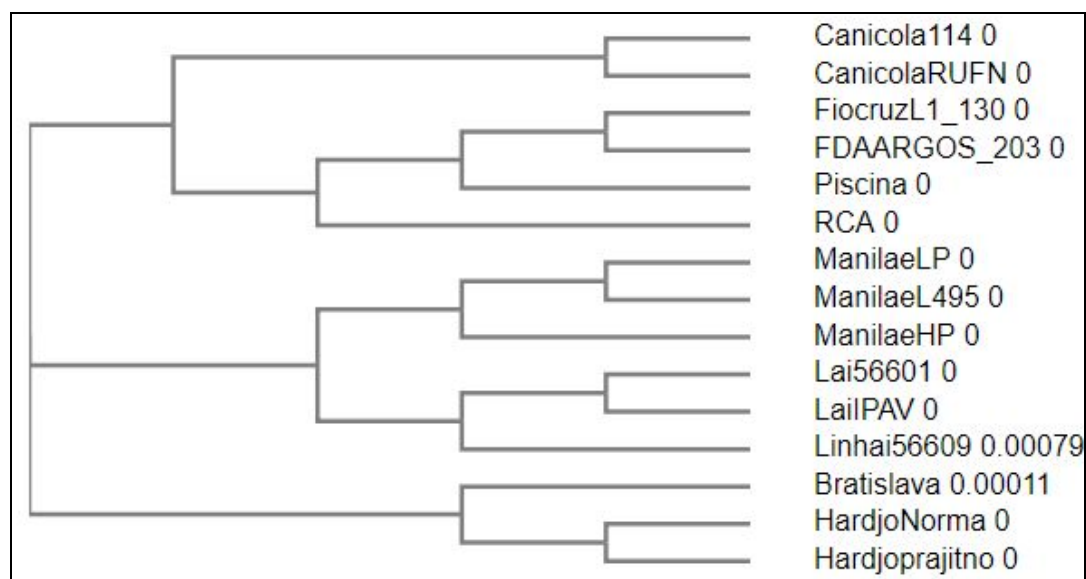
Na China, a hemorragia pulmonar associada à leptospirose tem sido uma complicação mais proeminente (NALLY et al., 2004). A similaridade da Esfingomielina fosfodiesterase hemolisina homóloga a LIC_12631 (Fig. 11) e SphH (Fig. 12) em sv. Lai str. 56601, sv. Lai str. IPAV e sv. Linhai str. 56609 pode ter alguma relação a isto, já que estas três linhagens foram isoladas de casos de leptospirose na China. Porém, síndrome de hemorragia pulmonar severa associada à leptospirose tem sido também uma preocupação mais frequente para leptospirose ocasionada por sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130 (GOUVEIA et al., 2008; SØNDERGAARD et al., 2016), que não tem a sequência nucleotídica para a esfingomielina fosfodiesterase hemolisina codificada por LIC_12631 tão similar às três linhagens da China.

Figura 11 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequencias de genes codificantes para putativas esfingomielina fosfodiesterase hemolisina homóloga a codificada por LIC_12631 nos diversos sorovares.



Fonte: MUSCLE.

Figura 12 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *sphH* nos diversos sorovares.



Fonte: MUSCLE.

MviN é uma proteína de membrana (JADHAV et al., 2014) e tem função relacionada com fixação e invasão de células eucarióticas (REN et al., 2003), sendo importante para a adaptação das leptospiras ao hospedeiro (ADHIKARLA et al., 2018). Deficiências em MviN geram uma interferência estrutural com a camada peptidoglicana, desse modo dificultando a sobrevivência da bactéria (JADHAV et al., 2014).

LptD é uma porina presente na membrana externa das leptospira, que possui um papel importante na sobrevivência da bactéria e na patogenia dela (GRASSMANN et al., 2017), já que sua função consiste na montagem de LPS da membrana externa das leptospiras (GRASSMANN; SOUZA; MCBRIDE, 2017).

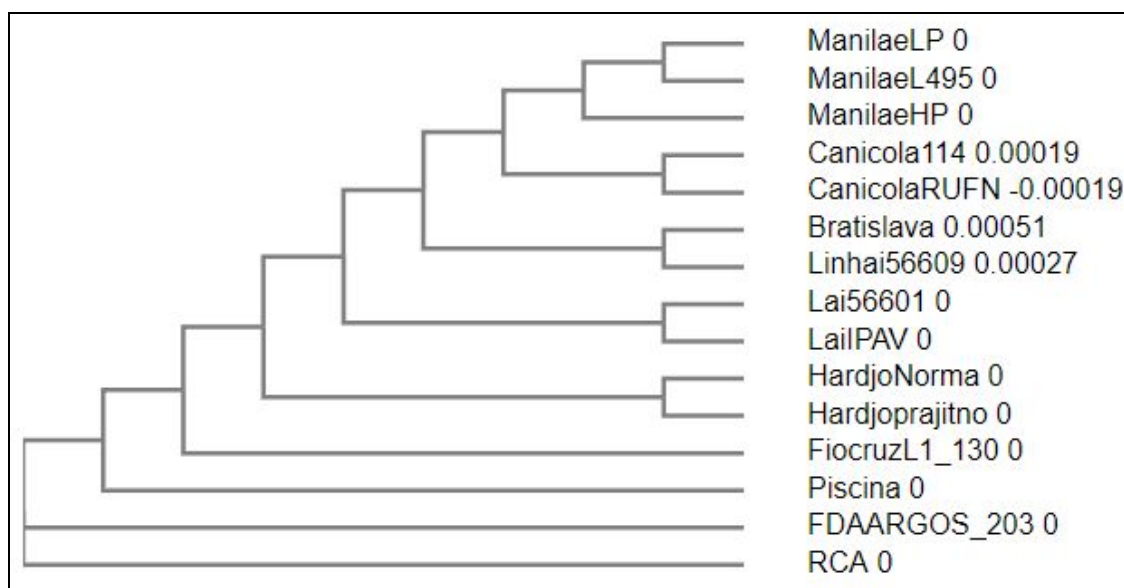
A peroxirredoxina é de suma importância para as leptospiras lidarem com estresse oxidativo (HOFMANN; HECHT; FLOHÉ, 2002; SAKOLVAREE et al., 2007), e é uma proteína envolvida na evasão do sistema imune do hospedeiro (ARIAS et al., 2014).

A flagelina, em conjunto com a proteína de bainha externa, ajuda a compor o flagelo das leptospiras (LIN; BUGHIO; SURUJBALLI, 1999). A flagelina, que possui uma localização periplasmática, é de extrema importância para a movimentação das leptospira dentro do

hospedeiro (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Colagenase é uma enzima capaz de quebrar a ligação peptídica do colágeno e está associada a dano a tecidos do hospedeiro, o que pode facilitar colonização, propagação, invasão e evasão do sistema imune pela bactéria (KASSENE et al., 2013; JANWITTHAYANAN et al., 2013). Parece também ter uma forte associação com hemorragia pulmonar (JANWITTHAYANAN et al., 2013). As sequências de genes codificantes para putativas colagenases parecem possuir bastante semelhança dentro de cada sorovar (Fig. 13).

Figura 13 - Árvore mostrando a semelhança entre as sequências putativas de *colA* nos diversos sorovares.



Fonte: MUSCLE.

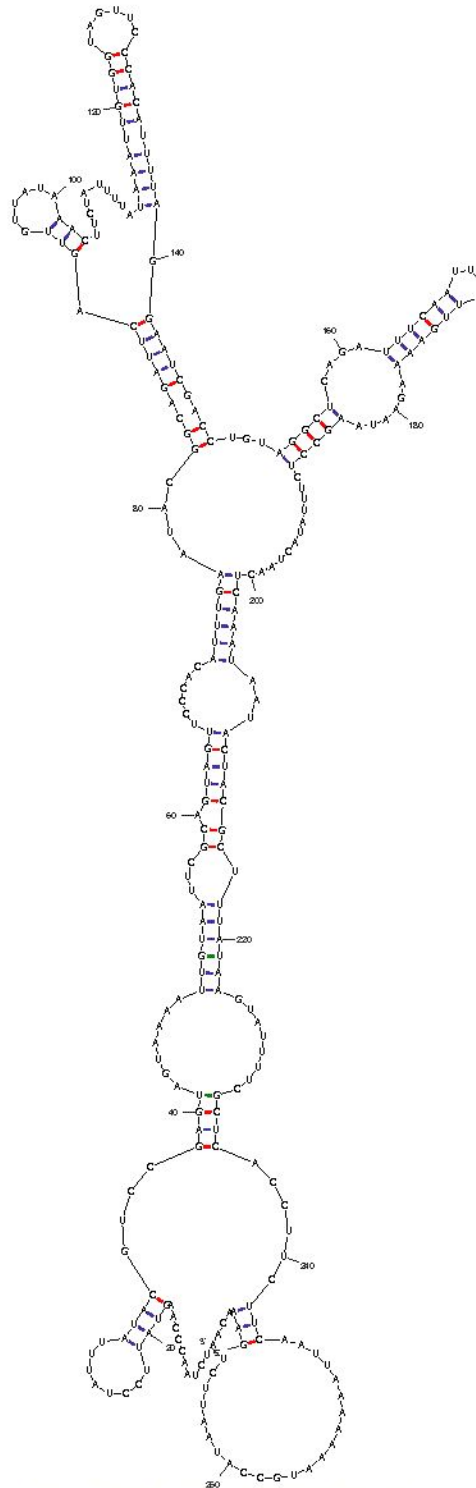
Para que se pudesse fazer maiores inferências entre as similaridades de fatores de virulência e a patogênese e virulência dos sv., seria necessário mais informações sobre os dados clínicos associados a cada sorovar. Porém é difícil ligar as linhagens com suas formas clínicas de leptospirose, tanto por haver poucos estudos ligando sintomas específicos de leptospirose e sua gravidade com sorovares ou linhagens, em geral parando-se a identificação da leptospira

causadora de determinado quadro clínico em nível de espécie. Também, estudos epidemiológicos costumam ser tendenciosos quanto a sua amostra, em função da regionalidade, da época e da população (AZHARI et al., 2018). Além de que não há muitos estudos com isolados de infecções assintomáticas, não permitindo assim estudos que possam definir um perfil de virulência realmente completo para as linhagens (SANTOS, 2015). Do mesmo modo, como a leptospirose se desenvolve e com que severidade pode ter relação com uma expressão diferencial de genes, porém não há estudos que tenham analisado o transcriptoma da bactéria em diferentes manifestações clínicas (SANTOS, 2015)

3.3 ESTRUTURA DOS sRNAs

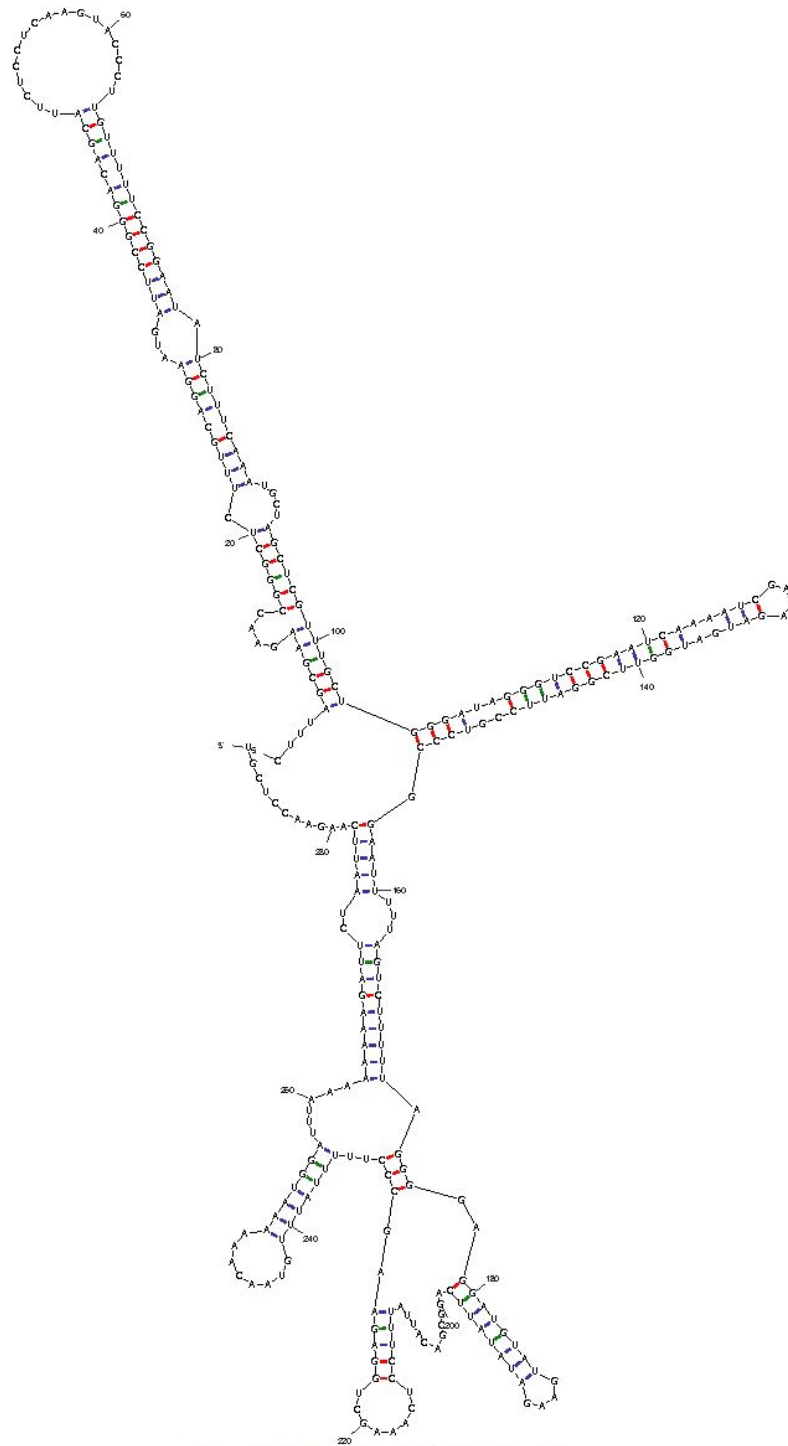
O software mfold previu duas possíveis estruturas para LIC1nc30 e oito para LIC1nc50. A partir disso, escolheu-se para cada um aquela estrutura que o programa considerou a mais provável devido ao gasto de energia (Fig. 14 e 15). Para o possível LIC1nc30 modificado de sv. *Canicola str. DU114*, o programa apenas previu uma estrutura, sendo esta a escolhida (Fig. 16).

Figura 14 - Estrutura mais provável do sRNA LIC1nc30.



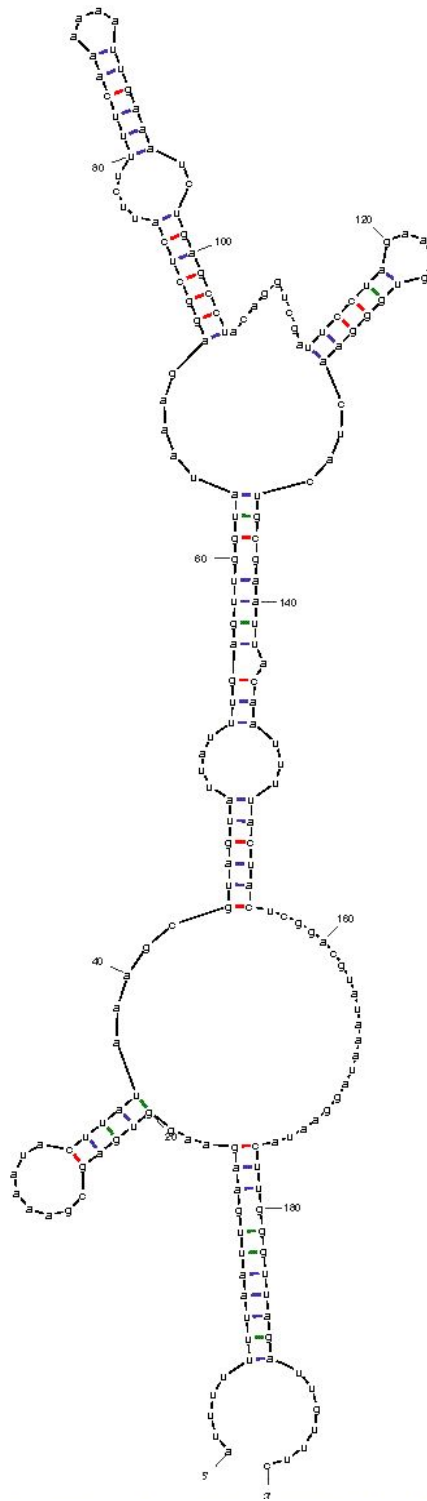
Fonte: mfold.

Figura 15 - Estrutura mais provável do sRNA LIC1nc50.



Fonte: mfold.

Figura 16 - Estrutura mais provável do sRNA de sv. Canicola str. DU114 semelhante a LIC1nc30.



Fonte: mfold.

As diferenças entre a possível estrutura de LIC1nc30 e a possível estrutura da forma alternativa de LIC1nc30 presente em sv. Canicola str. DU114 parecem afetar a estrutura do sRNA, porém atingem muitas partes configuradas em alça, indicando uma diferença de pareamento entre as duas formas. Mais sobre isto será tratado nos tópicos seguintes.

3.4 OUTROS ALVOS DE LIC1nc30 E LIC1nc50

Através dos dados obtidos pela ferramenta IntaRNA, encontrou-se outros possíveis alvos de regulação de LIC1nc30 e LIC1nc50, totalizando 100 outros alvos para cada sRNA. Escolhendo-se aqueles com um valor de p abaixo de 0,05, restou-se cinco pareamentos com LIC1nc30 e nenhum com LIC1nc50. Através das análises com a ferramenta BLAST, pode-se verificar se as sequências destes sRNAs de fato pareavam com partes do mRNA desta proteína, assim possibilitando que estes sRNAs funcionem como reguladores traducional. Do mesmo modo, verificou-se se o pareamento nos sRNAs compreendiam partes da sequência livre em alças, indicando que, portanto, os sRNAs seriam de fato capazes de parear com a proteína em questão. Com isso, viu-se que quatro destas proteínas podem de fato serem reguladas pelos sRNAs em questão (Quadro 7).

Quadro 7 - Possíveis Alvos de Regulação de LIC1nc30.

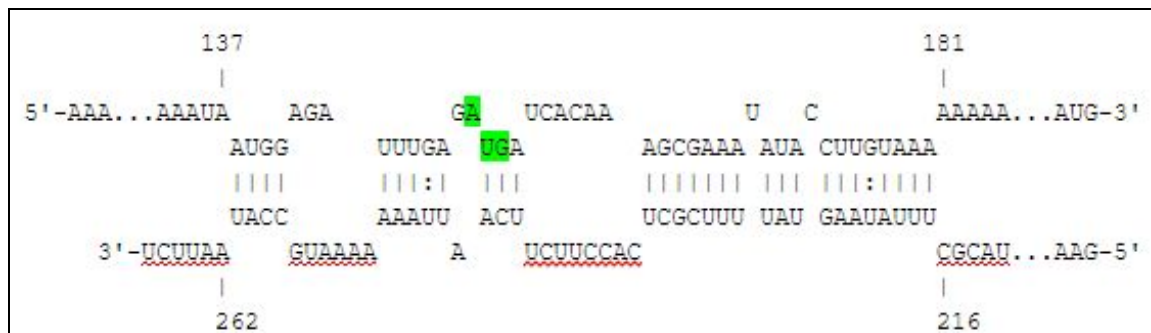
Valor de P	Proteína Alvo	Posição de Pareamento na Proteína	sRNA	Posição de Pareamento no sRNA	Anotação
0	LIC_RS21820	21 -- 139	LIC1nc30	63 -- 181	Proteína hipotética
1.21e-05	LIC_RS21585	4 -- 48	LIC1nc30	1 -- 46	Proteína hipotética
1.26e-05	LIC_RS21900	26 -- 89	LIC1nc30	118 -- 181	Proteína hipotética
6.27e-05	LIC_RS12970	43 -- 106	LIC1nc30	118 -- 181	Proteína hipotética

Fonte: IntaRNA, editado pela autora.

Além destes alvos, ao se fazer o IntaRNA entre os sRNAs e os fatores de virulência analisados no presente estudo, encontrou-se uma possível regulação traducional positiva entre cinco fatores de virulência para LIC1nc30 (Fig. 17 à 21) e dois para LIC1nc50 (Fig. 22 e 23).

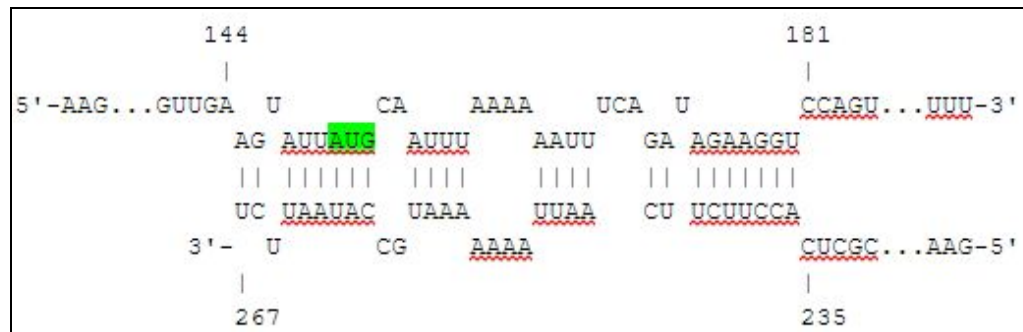
Houve pareamento entre ambos os sRNAs e os outros fatores de virulência, que não incluíam o RBS putativo ou o códon de início, podendo se tratar então de regulações traducionais negativas ou pós-transcricionais. Ou seja, é possível que estes sRNAs, ao se ligar nos mRNAs desses fatores de virulência, interfiram em um sítio para RNase e afetem, portanto, a estabilidade do mRNA (regulação pós-transcricional), seja criando (regulação negativa) ou ocluindo (regulação positiva) um destes sítios. Também, é possível que os mRNAs desses fatores de virulência tenham uma conformação que naturalmente oclua o RBS, e que o pareamento dos sRNAs envolva exatamente a sequência do mRNA que está ocluindo o RBS e, por isso, ao parear, deixe o RBS livre (regulação traducional positiva).

Figura 17 - Pareamento entre o mRNA codificante para a putativa hemolisina esfingomielina fosfodiesterase LIC_12632 e LIC1nc30



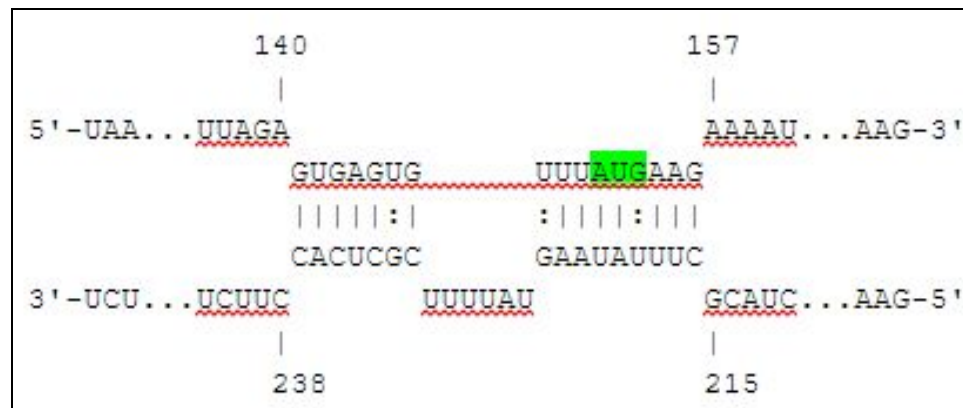
Fonte: IntaRNA, editado pela autora. A fita de cima representa o mRNA codificante para a putativa hemolisina, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em verde indica o códon de início.

Figura 18 - Pareamento entre o mRNA codificado por *rfbC* e LIC1nc30.



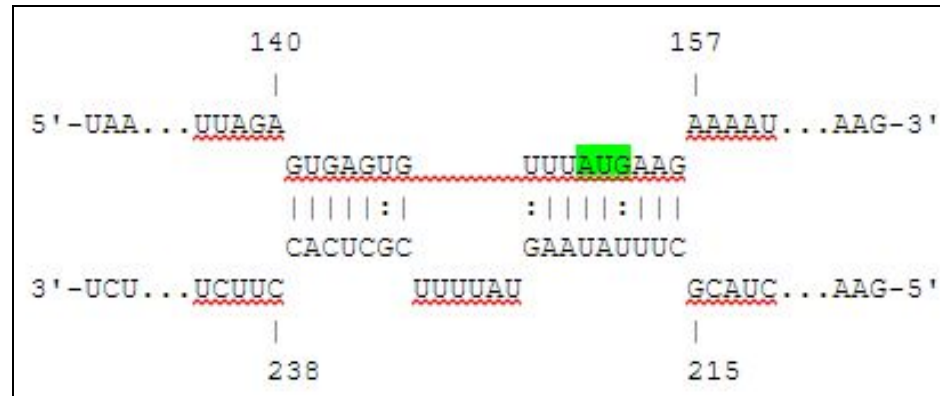
Fonte: IntaRNA, editado pela autora. A fita de cima representa o mRNA codificado por *rfbC*, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em verde indica o códon de início.

Figura 19 - Pareamento entre o mRNA codificante para o putativo LigB e LIC1nc30.



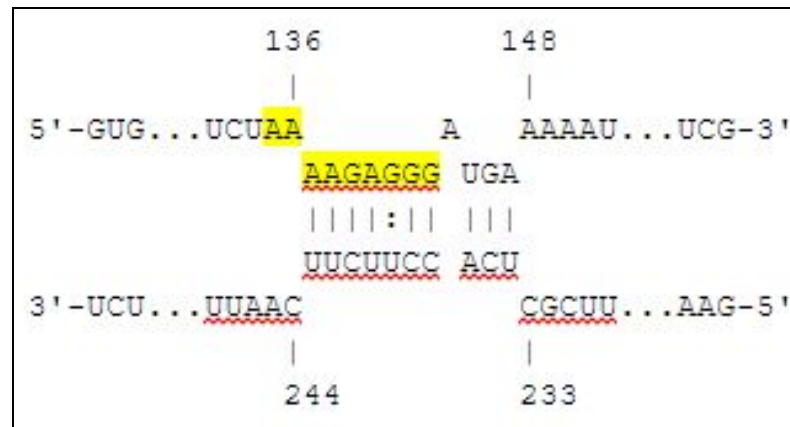
Fonte: IntaRNA, editado pela autora. A fita de cima representa o mRNA codificante para o putativo LigB, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em verde indica o códon de início.

Figura 20 - Pareamento entre o mRNA codificante para o putativo LigA e LIC1nc30.



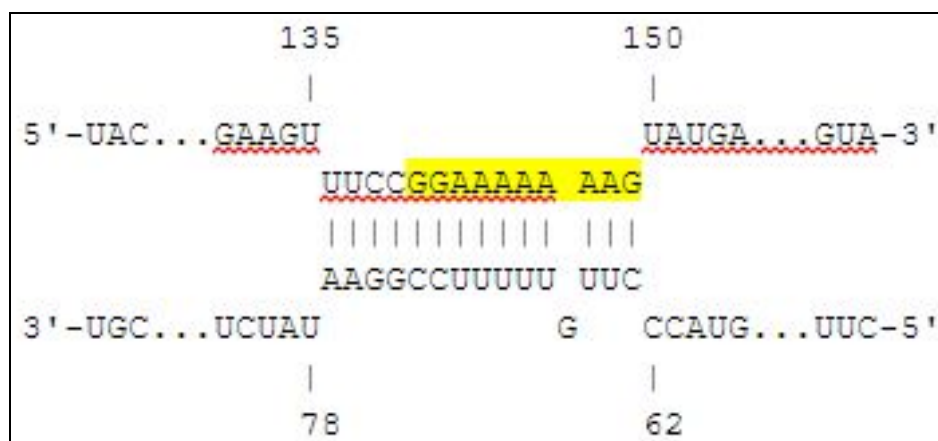
Fonte: IntaRNA, editado pela autora. A fita de cima representa o mRNA codificante para o putativo LigA, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em verde indica o códon de início.

Figura 21 - Pareamento entre o mRNA codificante para a putativa Peroxirredoxina e LIC1nc30.



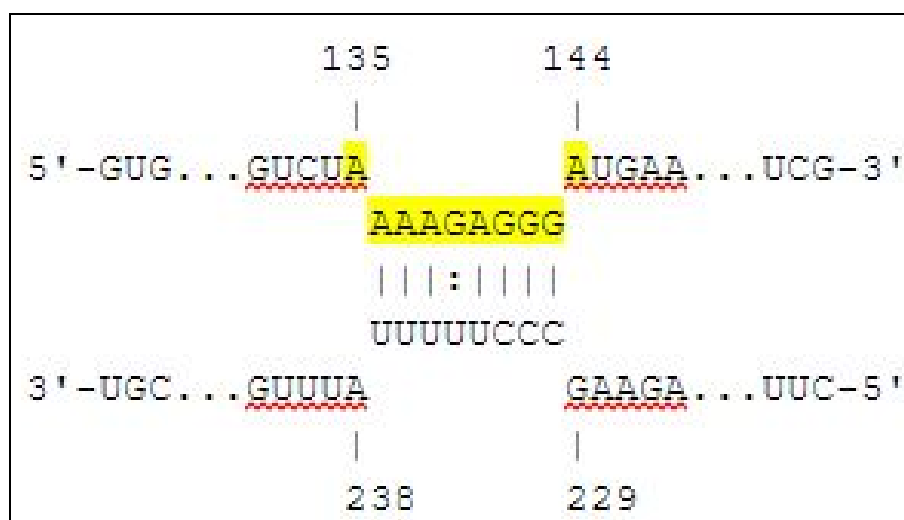
Fonte: IntaRNA, editado pela autora. A fita de cima representa o mRNA codificante para a putativa Peroxirredoxina, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em amarelo indica o RBS putativo.

Figura 22 - Pareamento entre o mRNA codificado por *rfbB* e LIC1nc50.



Fonte: IntaRNA, editado pela autora. A fita de cima representa o mRNA codificado por *rfbB*, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em amarelo indica o RBS putativo.

Figura 23 - Pareamento entre o mRNA codificante para a putativa Peroxirredoxina e LIC1nc50.



Fonte: IntaRNA, editado pela autora. A fita de cima representa o mRNA codificante para a putativa Peroxirredoxina, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em amarelo indica o RBS putativo.

3.5 ANÁLISE DOS GENES PUTATIVAMENTE REGULADOS POR LIC1nc30

A proteína hipotética possivelmente codificada por LIC_RS21900 não apresentou correspondência a nenhum domínio conhecido de acordo com os programas Pfam, SMART e

Phyre2. TCBD não identificou nenhuma possível região transmembrana, enquanto I-TASSER identificou um possível sítio de ligação para sulfato. Em *Neisseria meningitidis*, já foi descrito uma maior expressão de transportadores de sulfato quando esta bactéria estava em contato com células epiteliais humanas, podendo haver uma relação entre transportadores de sulfato e virulência (GRIFANTINI et al., 2002)

Já a proteína hipotética putativa codificada por LIC_RS21820, tanto o Pfam, SMART e Phyre2 concordam que sua proteína possui um domínio de integrase de núcleo. TCBD não identificou nenhuma possível região transmembrana. O programa I-TASSER identificou que esta proteína poderia possuir um sítio de ligação para magnésio. Já foi descrito para *Leishmania major* transportador de magnésio que é mais expresso durante à infecção no hospedeiro, sendo associado a este transportador um possível papel no auxílio à virulência (ZHU et al., 2009). Porém, nenhuma relação entre magnésio e virulência foi estabelecido para *L. interrogans*.

Em relação a proteína hipotética codificada por LIC_RS21585, Pfam, SMART e Phyre2 não encontraram correspondência com nenhum domínio conhecido. TCBD não identificou nenhuma possível região transmembrana. I-TASSER também identificou um possível sítio de ligação para cálcio. Já foi descrita, para outras bactérias, uma relação entre cálcio e fatores de virulência. Por exemplo, para espécies do gênero *Yersinia* já foi descrito cálcio como um repressor de fatores de virulência (MEKALANOS, 1992; BÖLIN; WOLF-WATZ, 1988). Contudo, em *Pseudomonas aeruginosa*, um aumento de cálcio já foi relacionado a um aumento da virulência, com este aumento resultando em uma maior expressão de três proteases e maior produção de biofilme (SARKISOVA et al., 2005). LipL32, um fator de virulência, parece ter sua atividade mediada por cálcio (FRASER; BROWN, 2017), sendo possível que esta proteína hipotética contribua para o funcionamento de LipL32, e, portanto, contribua para um aumento da virulência em sorovares de *L. interrogans*

Por último, em relação ao produto gênico codificado por LIC_RS12970, Pfam e Phyre2 não encontraram nenhum domínio conhecido, SMART e TCBD ambos encontraram uma região transmembrana. De acordo com o I-TASSER, é possível que esta proteína hipotética tenha um sítio de ligação para manose. *L. interrogans* possui a manose como principal carboidrato em sua superfície, o que pode estar relacionado à unidade manobiose, que consiste na principal molécula

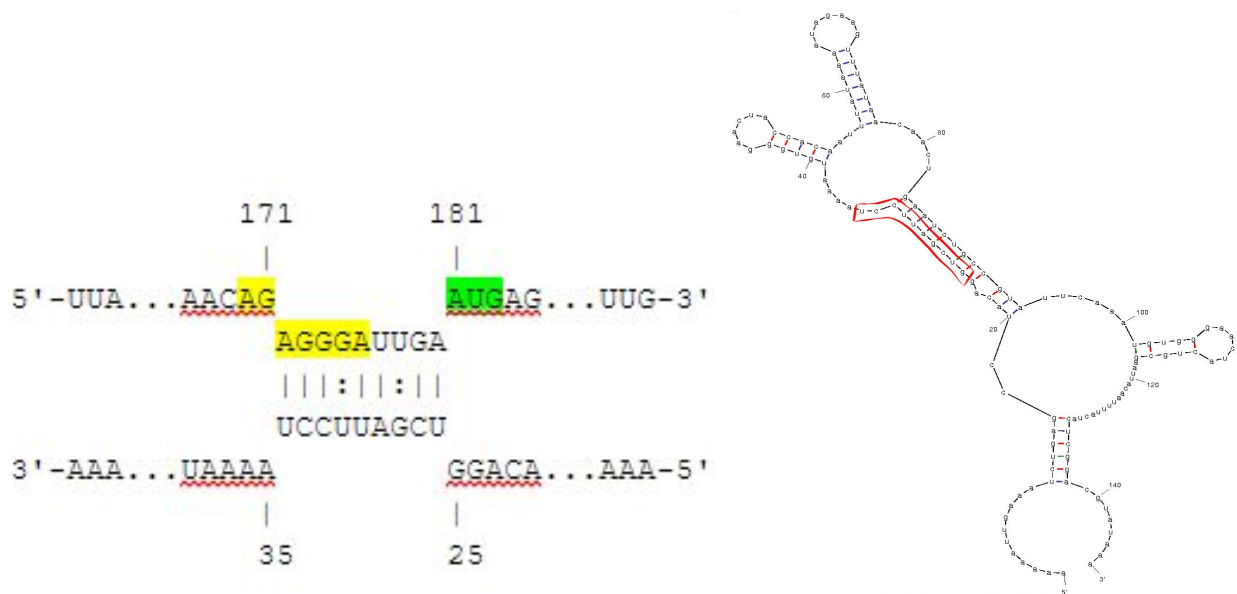
polissacarídica no LPS de leptospira, sendo também um importante antígeno (GAUDART et al., 2008). Apesar de não haver literatura científica relacionando a manose em si à virulência, a manose é essencial para a produção de glicoconjugados, que são relevantes para a virulência de leptospiras (DIEZ et al., 2009).

3.6 ANÁLISE DE sRNAs DOS SOROVARES

A partir da análise de IntaRNA entre a sequência de LIC1nc30 para sv. Canicola str. DU114 e as termolisinas, pode-se perceber que a deleção de 95 nucleotídeos de LIC1nc30 afeta sua capacidade de pareamento com as termolisinas, podendo indicar uma possível perda de função deste sRNA em sv. Canicola str. DU114.

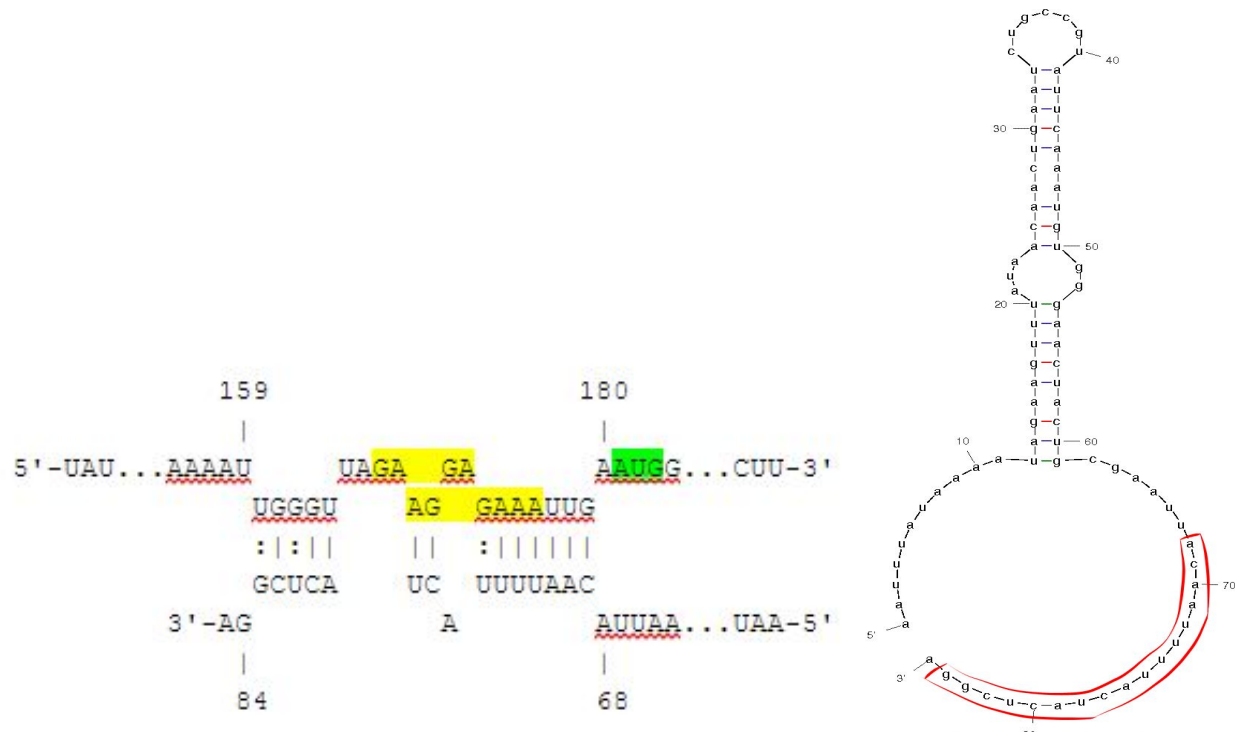
Foram encontrados, em sv. Manilae isolado L495, dois sRNAs que parecem corresponder a partes da sequência homóloga a LIC1nc30 neste sorovar: sRNA_30_251 e sRNA_37_187. Estes sRNAs, ao serem analisados pelo IntaRNA quanto a possibilidade de parearem com as termolisinas de sv. Manilae isolado L495, pode-se perceber que sRNA_30_251 é capaz de parear com a sequência homóloga a termolisina LIC13322 na porção referente ao RBS putativo da proteína em questão (Figura 24), porém este pareamento envolve apenas dois nucleotídeos que estariam livres no sRNA, o que colocaria em questão sua real possibilidade de parear com a termolisina. Do mesmo modo, sRNA_37_187 é capaz de parear com a sequência homóloga a LIC13320, também na porção referente ao RBS putativo (Figura 25). Houve pareamento entre ambos os sRNAs e o restante das termolisinas, mas, por não abrangerem nem o RBS nem o códon de início, não podem participar de uma regulação traducional negativa, todavia não se pode descartar uma possível regulação pós-transcricional ou ainda uma regulação traducional positiva.

Figura 24 - Pareamento entre sRNA_30_251 de sv. *Manilae* isolado L495 e termolisina homóloga a LIC13322, assim como a estrutura de sRNA_30_251.



Fonte: IntaRNA e mfold, editados pela autora. A fita de cima representa o mRNA da termolisina codificada pela sequência homóloga a LIC13322, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em amarelo indica o RBS putativo, enquanto a marcação em verde indica o códon de início. A caixa vermelha na estrutura do sRNA indica o local onde ocorreria o pareamento.

Figura 25 - Pareamento entre sRNA_37_187 de sv. Manilae isolado L495 e termolisina homóloga a LIC13320.



Fonte: IntaRNA e mfold, editados pela autora. A fita de cima representa o mRNA da termolisina codificada pela sequência homóloga a LIC13320, enquanto a fita de baixo indica o sRNA. A marcação em amarelo indica o RBS putativo, enquanto a marcação em verde indica o códon de início. A caixa vermelha na estrutura do sRNA indica o local onde ocorreria o pareamento.

Esses dados de pareamento podem indicar que de fato estes sRNAs podem ser formas processadas de LIC1nc30, sendo necessário mais análises tanto em sv. Manilae isolado L495, quanto em sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130, à procura da existência destes três sRNAs em ambas as linhagens, assim como em quais condições estes podem aparecer, o que pode trazer mais informações de como e quando estes sRNAs atuam.

Todavia, a presença da sequência de LIC1nc50 sem sua expressão em sv. Manilae isolado L495 indica que apenas a presença da sequência desses sRNAs não se traduz necessariamente em sua expressão como sRNA, não permitindo que isso seja usado como uma indicação da conservação do sRNA LIC1nc50 nem de sua importância como sRNA regulatório. Também, pela

falta de trabalhos que investiguem a expressão de sRNAs em outros sorovares, não se sabe da possibilidade de expressão de sRNAs nestes outros sorovares. Pela diferença de expressão entre sv. Copenhageni e sv. Manilae, com sv. Copenhageni expressando 11 sRNAs incluindo LIC1nc30 e LIC1nc50 (Caimano et al., 2014), e sv. Manilae expressando mais de 200 sRNAs (Zhukova et al., 2017), nenhum destes incluindo qualquer forma de LIC1nc50, não é possível inferir o padrão de expressão de sRNAs nos outros sorovares, no máximo extrapolando esse padrão de expressão para linhagens dentro do mesmo sorovar. Porém, tendo em vista que há uma grande diferença genômica entre sorovares, ainda é questionável esta extrapolação, sendo necessário mais estudos em relação a expressão gênica dos sorovares.

3.7 ÁRVORE FILOGENÉTICA

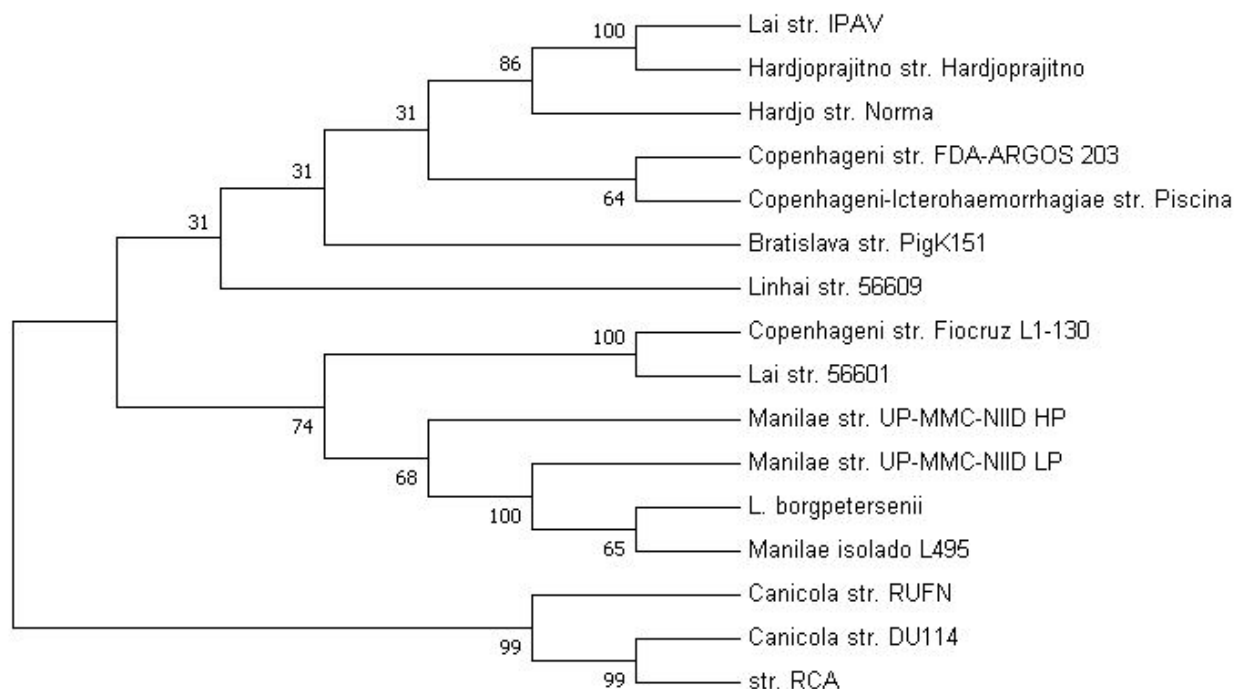
A determinação das sequências dos genes para rRNAs (RNA ribossomal) de diversos organismos é usada como base para estudos filogenéticos e evolutivos (ASAI et al., 1999). O rRNA 16S é muito utilizado para este tipo de estudo devido a sua mudança evolucionária aparentemente lenta, resultando em sucessos em sua aplicação em diversos casos (ASAI et al., 1999), assim como por se acreditar que esta sequência seja pouco afetada por transferência horizontal de genes (ACINAS et al., 2004). Utilizando essa abordagem já se definiu diversos estudos filogenéticos, incluindo a filogenia de espiroquetas até nível de gênero (HOOKEY; BRYDEN; GATEHOUSE, 1993).

Apesar da tremenda utilidade do gene codificante para o RNA ribossomal 16S em se propor relações filogenéticas entre grupos, sua precisão diminui ao se tratar do nível de espécie ou sorovar (TAN et al., 2013), sendo necessário encontrar outros marcadores que permitam resolver as relações destes táxons. Também, pode ser questionável o uso do 16S ao se tratar de determinados grupos, já que por muitas vezes bactérias possuem para seus rRNAs múltiplos operons heterogêneos, geralmente envolvendo os rRNAs 16S, 23S e 5S, podendo conter entre 1 e 15 destes operons num mesmo genoma, podendo resultar, então, em diversas sequências diferentes para estes rRNAs em um mesmo organismo (ACINAS et al., 2004)

Por conta disso, para se propor uma filogenia entre os sorovares utilizados no presente

estudo, procurou-se na literatura outros marcadores que pudessem ser utilizados. Uma abordagem MLST possui uma especificidade maior ao se tratar de leptospiros patogênicos do que uma abordagem utilizando o gene codificante para o rRNA 16S, apresentando um número menor de ramos ambíguos. Outros estudos utilizando a abordagem MLST para a filogenia de leptospiros patogênicos já demonstraram um potencial desta abordagem em definir a filogeografia das espécies de leptospira através do tempo e de também ligá-las aos seus hospedeiros de manutenção (BOONSILP et al., 2013). Com isso em mente, a árvore filogenética presente na figura 26 foi montada utilizando uma abordagem MLST.

Figura 26. Árvore filogenética de sorovares de *L. interrogans*.



Fonte: MEGA7.

Não houve um agrupamento dos sorovares nesta árvore filogenética, isso pode ser devido a uma não especificidade dos genes utilizados na abordagem MLST em nível de sorovar. Porém, isso pode ter acontecido também pois, de acordo com estudos anteriores, sorovares não são bons indicadores de semelhança genética e podem variar imensamente até dentro de uma mesma

linhagem, provavelmente devido à transferência horizontal de genes (BOONSILP et al., 2013). Contudo, outros estudos corroboram com a primeira hipótese, notando que, em filogenias utilizando MLST, as linhagens de leptospiras em questão agrupavam-se em relação à espécie, e não em relação ao sorogrupo ou sorovar (NALAM et al., 2010; JAEGER et al., 2018).

No estudo de Jaeger e colaboradores (2018), a árvore filogenética presente no estudo agrupava sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130 e sv. Copenhageni FDA-ARGOS 203 como grupos irmãos, assim como sv. Canicola str. RUFN e sv. Canicola str. DU114, o que não acontece neste presente estudo. Em contrapartida, Jaeger e colaboradores não incluíram str. RCA em sua análise filogenética, portanto, possivelmente justificando sua posição nesta árvore separando sv. Canicola str. RUFN e sv. Canicola str. DU114 como grupos irmãos.

Era esperado que as linhagens pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, ao qual o sorovar Copenhageni e *Icterohaemorrhagiae* fazem parte, formassem um grupo dentro da filogenia, tendo em vista que o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* é considerado ter suas linhagens no mundo todo muito similares entre si (JAEGER et al., 2018), com poucas diferenças genéticas entre os sorovares Copenhageni e *Icterohaemorrhagiae* (SANTOS, 2015), porém este não foi o caso encontrado nesta filogenia.

De acordo com outro estudo, sv. Hardjo-prajitno str. Hardjoprajitno possui 99,9% de similaridade com sv. Hardjo str. Norma quanto a sequência nucleotídica (LLANES; RESTREPO; RAJEEV, 2016), contrariando o resultado dado na árvore deste trabalho. Este mesmo estudo, considerou que sv. Manilae seria o sorovar mais provável de estar na base da árvore, o que novamente contraria o resultado aqui encontrado.

Em geral, considera-se que características suficientemente complexas dificilmente evoluirão mais que uma vez independentemente, agrupando, portanto, táxons que compartilhem este tipo de característica (WOESE, 1987), com isso, esperava-se que sv. Lai str. IPAV e sv. Lai str. 56601 estivessem agrupados como grupos irmãos, tendo em vista que ambas as linhagens possuem uma forma alternativa da termolisina LIC13322, com 100% de similaridade entre si. Concordando com esta ideia, estudos anteriores caracterizaram essa duas linhagens como muito parecidas entre si (HUANG et al., 2014).

Levando em conta todas estas divergências entre esta filogenia e outros estudos,

propõe-se utilizar outro tipo de método para classificar filogeneticamente e/ou genotipar sorovares de *L. interrogans*. Sendo de suma importância que se ache este tipo de método, tendo em vista que este seria um passo essencial para que seja possível coletar e analisar dados concisos e transponíveis entre estudos baseados neste tipo de classificação, que já é possível para outras espécies de bactéria (AHMED et al., 2011).

4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSÃO

Não foi possível realizar correlações entre sorovares e distribuição de fatores de virulência sob um ponto de vista evolutivo, sendo possivelmente necessária uma maior seleção de fatores de virulência para análise, assim como mais estudos identificando outros possíveis fatores de virulência. Também é necessário mais estudos em relação ao transcriptoma de cada sorovar sob diversas condições clínicas para que se possa fazer uma análise mais confiável relacionando expressão de determinados fatores de virulência e a virulência e patogênese de cada sorovar.

É possível que os sRNAs analisados neste trabalho, tanto de sv. Manilae isolado L495 quanto sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, regulem diversas proteínas, principalmente de modo traducional negativo. Incluindo nestas proteínas fatores de virulência bem descritos, como as termolisinas, e proteínas hipotéticas com possíveis papéis como fatores de virulência, sendo necessário mais estudos para caracterizar tais proteínas hipotéticas.

É possível que sv. Manilae isolado L495 possua sRNAs equivalentes a LIC1nc30 de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, o que pode significar que outros sorovares também possuam sRNAs homólogos a LIC1nc30, porém ainda é necessário mais estudos analisando o transcriptoma dos diversos sorovares em mais de uma condição para que seja possível se tirar maiores conclusões.

O método MLST (fazendo uso de oito loci) pode não ser o ideal tanto para genotipagem quanto para filogenia em nível de sorovar e linhagem, sendo necessário procurar algum outro método que permita esta especificidade (e.g. MLST usando 50 loci).

Levando-se em conta que todas as análises feitas no presente estudo foram *in silico*, apenas é possível indicar as possibilidades de regulação dos sRNAs, assim como dos genes de

virulência, sendo necessário estudos *in vivo* para confirmações mais concretas.

4.2 PERSPECTIVAS

Usando como base os dados obtidos nesta dissertação, propõe-se montar uma linhagem de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130 que seja capaz de expressar de forma constitutiva os pequenos RNAs LIC1nc30 e LIC1nc50 e que se avalie o efeito destes na produção das diversas termolisinas, assim como na produção de outros fatores de virulência, e na fisiologia da bactéria, comparando-se também com uma linhagem não modificada de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130.

Pouco se sabe sobre informações básicas de cada sorovar de *L. interrogans*, sendo necessário se fazer muitos estudos de base para que seja possível fazer mais análises *in silico* que permitam maiores inferências, assim como guiar melhor estudos acerca do tema.

5 REFERÊNCIAS

ABELA-RIDDER, Bernadette; SIKKEMA, Reina; HARTSKEERL, Rudy A.. Estimating the burden of human leptospirosis. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 36, p.5-7, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.012>.

ACINAS, Silvia G. et al. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **Journal Of Bacteriology**, [s. L.], v. 186, n. 9, p.2629-2635, maio 2004.

ADHIKARLA, Haritha et al. Lvr, a Signaling System That Controls Global Gene Regulation and Virulence in Pathogenic *Leptospira*. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-13, 23 fev. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2018.00045>.

ADLER, Ben et al. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 153, n. 1-2, p.73-81, nov. 2011. Elsevier BV.

ADLER, Ben; MOCTEZUMA, Alejandro de La Peña. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 140, n. 3-4, p.287-296, jan. 2010. Elsevier BV.

AGAMPODI, S. B. et al. Outbreak of leptospirosis after white-water rafting: sign of a shift from rural to recreational leptospirosis in Sri Lanka?. **Epidemiology And Infection**, [s.l.], v. 142, n. 04, p.843-846, 26 jun. 2013. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268813001465>.

AHMED, Ahmed et al. Comparison of Two Multilocus Sequence Based Genotyping Schemes for *Leptospira* Species. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.1-8, 8 nov. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001374>.

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 215, n. 3, p.403-410, out. 1990. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).

AMAMURA, Thais A. et al. Pathogenic *Leptospira* Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition. **Frontiers In Microbiology**, [S. l.], v. 8, p.1-16, 30 maio 2017. Frontiers Media SA.

ARIAS, Diego G. et al. Kinetic and structural characterization of a typical two-cysteine peroxiredoxin from *Leptospira interrogans* exhibiting redox sensitivity. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 77, p.30-40, dez. 2014. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.014>.

ARMSTRONG, Peter B.. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. **Immunobiology**, [s.l.], v. 211, n. 4, p.263-281, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2006.01.002>.

ARTIUSHIN, S. et al. Host-Inducible Immunogenic Sphingomyelinase-Like Protein, Lk73.5, of *Leptospira interrogans*. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 72, n. 2, p.742-749, 23 jan. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.2.742-749.2004>.

ASAI, Tsuneaki et al. An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: Complete exchange of rRNA genes between bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, [s. L.], v. 96, n. 5, p.1971-1976, mar. 1999.

AZHARI, Nurul Natasya et al. Molecular characterization of pathogenic *Leptospira* sp. in small mammals captured from the human leptospirosis suspected areas of Selangor state, Malaysia. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 188, p.68-77, dez. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.020>.

BALLARD, Susan et al. Molecular analysis of the *dnaK* locus of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Gene**, [s.l.], v. 216, n. 1, p.21-29, ago. 1998. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00329-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00329-1).

BARBOSA, A. S. et al. A Newly Identified Leptospiral Adhesin Mediates Attachment to Laminin. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 74, n. 11, p.6356-6364, 5 set. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00460-06>.

BENSON, Dennis A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.36-42, 26 nov. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1195>.

BERTANI, G.. Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 186, n. 3, p.595-600, 16 jan. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.186.3.595-600.2004>.

BHARTI, Ajay R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 12, p.757-771, dez. 2003. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2).

BLAZIUS, Renê D. et al. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na Cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p.1952-1956, 2005.

BÖLIN, I.; WOLF-WATZ, H.. The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.237-245, mar. 1988. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1988.tb00025.x>.

BOONSILP, Siriphan et al. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-10, 24 jan. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001954>.

BOUCHET, V. et al. Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 15, p.8898-8903, 10 jul. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1432026100>.

BOURHY, P. et al. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 64, n. 12, p.4061-4067, 23 set. 2014. Microbiology Society.

CABELLO, Felipe C.; SARTAKOVA, Marina L.; DOBRIKOVA, Elena Yu. Genetic manipulation of spirochetes – light at the end of the tunnel. **Trends In Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 6, p.245-248, jun. 2001. Elsevier BV.

CAIMANO, Melissa J. et al. A Model System for Studying the Transcriptomic and Physiological Changes Associated with Mammalian Host Adaptation by *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **Plos Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 3, p.1-19, mar. 2014. Public Library of Science (PLOS).

CHOY, H. A. et al. Physiological Osmotic Induction of *Leptospira interrogans* Adhesion: LigA and LigB Bind Extracellular Matrix Proteins and Fibrinogen. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 75, n. 5, p.2441-2450, 12 fev. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01635-06>.

COSATE, Maria Raquel V. et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. **Bmc Veterinary Research**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-12, 15 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-017-1081-9>.

COSTA, Federico et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1-19, 17 set. 2015. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.

CULLEN, P. A.. Global Analysis of Outer Membrane Proteins from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 70, n. 5, p.2311-2318, 1 maio 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.70.5.2311-2318.2002>.

DAVIDSON, L. S. P. et al. Weil's Disease (Leptospirosis): A Clinical and Bacteriological Study of Nineteen Cases Occurring Chiefly Among Fish Workers. **British Medical Journal**, Londres, v. 3859, p.1137-1142, 22 dez. 1934.

DATASUS. Ministério da Saúde: Departamento de Informática do SUS. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/leptobr.def>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

DIEZ, Matías D. Asención et al. Functional characterization of GDP-mannose pyrophosphorylase from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Archives Of Microbiology**, [s.l.], v. 192, n. 2, p.103-114, 25 dez. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-009-0534-3>.

DONG, Shi-lei et al. A leptospiral AAA+ chaperone–Ntn peptidase complex, HslUV, contributes to the intracellular survival of *Leptospira interrogans* in hosts and the transmission of leptospirosis. **Emerging Microbes & Infections**, [S. l.], v. 6, n. 11, p.1-16, 29 nov. 2017. Springer Nature.

EDGAR, R. C.. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.1792-1797, 8 mar. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

EVANGELISTA, Karen V; COBURN, Jenifer. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.1413-1425, set. 2010. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.102>.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. Ed. Melbourne: MediSci, p. 353, 1999

FINN, Robert D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.279-285, 15 dez. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1344>.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L.. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. **Scandinavian Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 73, n. 5, p.408-419, 25 mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x>.

FRAGA, Tatiana Rodrigues et al. Immune Evasion by Pathogenic Leptospira Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 209, n. 6, p.876-886, 26 out. 2013. Oxford University Press (OUP).

FRAGA, Tatiana Rodrigues. **IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES DE LEPTOSPIRA ENVOLVIDAS COM MECANISMOS DE ESCAPE DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO**. 2014. 51 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

FRAGA, Tatiana Rodrigues; ISAAC, Lourdes; BARBOSA, Angela Silva. Complement Evasion by Pathogenic Leptospira. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 7, p.1-7, 21 dez. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00623>.

FRASER, Tricia; BROWN, Paul D.. Temperature and Oxidative Stress as Triggers for Virulence Gene Expression in Pathogenic *Leptospira* spp. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-13, 9 maio 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00783>.

GAUDART, Narintorn et al. *Leptospira interrogans* recognized through DC-SIGN and induces maturation and cytokine production by human dendritic cells. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.359-367, ago. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2008.00437.x>.

GENEVA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. . **Diseases Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG)**. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/index2.html>>. Acesso em: 15 out. 2018.

GOUVEIA, Edilane L. et al. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.505-508, mar. 2008. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1403.071064>.

GRASSMANN, André Alex; SOUZA, Jéssica Dias; MCBRIDE, Alan John Alexander. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction?. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 8, p.1-8, 9 mar. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00256>.

GRASSMANN, André Alex et al. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 8, p.1-20, 27 abr. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00463>.

GRIFANTINI, Renata et al. Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 20, n. 9, p.914-921, 12 ago. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt728>.

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 69, n. 8, p.4958-4968, 1 ago. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.69.8.4958-4968.2001>.

GUPTA, Radhey S.; MAHMOOD, Sharmeen; ADEOLU, Mobolaji. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades: proposal for a taxonomic revision of the phylum. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 4, p.1-18, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00217>.

HARTSKEERL, R.a.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.a.. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.494-501, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>.

HEROVEN, Ann Kathrin et al. A Csr-type regulatory system, including small non-coding RNAs, regulates the global virulence regulator RovA of *Yersinia pseudotuberculosis* through RovM. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 5, p.1179-1195, jun. 2008. Wiley-Blackwell.

HOFMANN, B.; HECHT, H.-j.; FLOHÉ, L.. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, [s.l.], v. 383, n. 3-4, p.1-18, 12 jan. 2002. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/bc.2002.040>.

HOOKEY, John V.; BRYDEN, Julia; GATEHOUSE, Laurence. The use of 16s Leptospiraceae rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of and related spirochaetes. **Journal Of General Microbiology**, [s. L.], v. 139, p.2585-2590, maio 1993.

HUANG, Lili et al. Re-characterization of an extrachromosomal circular plasmid in the pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Lai strain 56601. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, [s.l.], v. 46, n. 7, p.605-611, 29 maio 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmu033>.

INADA, Ryokichi et al. The Etiology, Mode of Infection, and Specific Therapy of Weil's Disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica). **The Journal Of Experimental Medicine**. New York City, p. 377-402. 1 mar. 1916. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2125418/>. Acesso em: 10 jan. 2018.

JADHAV, Ankush et al. Unraveling novel broad-spectrum antibacterial targets in food and waterborne pathogens using comparative genomics and protein interaction network analysis. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 27, p.300-308, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.007>.

JAEGER, Lauren Hubert et al. Characterization of the clonal subpopulation Fiocruz L1-130 of *Leptospira interrogans* in rats and dogs from Brazil. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 67, n. 9, p.1361-1367, 1 set. 2018. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000806>.

JANWITTHAYANAN, Weena et al. In vivo gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 168, n. 5, p.268-272, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.005>.

JOHNSON, Russell C.. *Leptospira*. In: JOHNSON, Russell C.. **Medical Microbiology**. 4. ed. Texas, Usa: Galveston (tx), 1996. Cap. 35. p. 5-10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8451/>. Acesso em: 7 out. 2018.

JOLLEY, Keith A.; BRAY, James E.; MAIDEN, Martin C. J.. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Research**, [s.l.], v. 3, p.1-20, 24 set. 2018. F1000 Research, Ltd.. <http://dx.doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>.

KANEHISA, Minoru et al. New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], p.1-6, 13 out. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky962>

KASAROV, L. B. Degradation Of The Erythrocyte Phospholipids And Haemolysis Of The Erythrocytes Of Different Animal Species By Leptospirae. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.29-37, 1 fev. 1970. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-3-1-29>.

KASSENE, Kokouvi et al. Identification of Collagenase as a Critical Virulence Factor for Invasiveness and Transmission of Pathogenic Leptospira Species. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 209, n. 7, p.1105-1115, 25 nov. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit659>.

KATZ, Alan R. et al. Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998: epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, S.i., v. 66, n. 1, p.31-70, jan. 2002.

KELLEY, Lawrence A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.845-858, 7 maio 2015. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.

KING, Amy M. et al. High-Temperature Protein G Is an Essential Virulence Factor of Leptospira interrogans. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 82, n. 3, p.1123-1131, 23 dez. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01546-13>.

KO, Albert I.; GOARANT, Cyrille; PICARDEAU, Mathieu. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 10, p.736-747, out. 2009. Springer Nature.

KOIZUMI, Nobuo; WATANABE, Haruo. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, [s.l.], v. 22, n. 11-12, p.1545-1552, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.007>.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v.

33, n. 7, p.1870-1874, 22 mar. 2016. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

LANGONI, HELIO. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. São Paulo, volume 2, fascículo 1, p. 52 - 58, 1999

LEE, S. H.. Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a Pore-Forming Protein on Mammalian Cells. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.315-322, 1 jan. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.70.1.315-322.2002>.

LEE, Seoung Hoon et al. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. **Gene**, [s.l.], v. 254, n. 1-2, p.19-28, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00293-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00293-6).

LEHMANN, Jason et al. Leptospiral Pathogenomics. **Pathogens**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.280-308, 10 abr. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens3020280>.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.493-496, 10 out. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx922>.

LEVETT, P. N. et al. Two Methods for Rapid Serological Diagnosis of Acute Leptospirosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.349-351, 1 mar. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cdli.8.2.349-351.2001>.

LEVETT, P. N.. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.296-326, 1 abr. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.14.2.296-326.2001>.

LEVETT, Paul N.. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 4, p.447-452, 15 fev. 2003. Oxford University Press (OUP).

LILENBAUM, Walter. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1996). **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.61-63, 1998. Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP.
<http://dx.doi.org/10.1590/s1413-95961998000200002>.

LIN, M.; BUGHIO, N.; SURUJBALLI, O.. Expression in Escherichia coli of flaB, the gene coding for a periplasmic flagellin of Leptospira interrogans serovar pomona. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 11, p.977-982, 1 nov. 1999. Microbiology Society.
<http://dx.doi.org/10.1099/00222615-48-11-977>.

LING, Jessmi M.I et al. The mviN homolog in Burkholderia pseudomallei is essential for viability and virulence. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 9, p.831-842, set. 2006. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/w06-042>.

LLANES, Alejandro; RESTREPO, Carlos Mario; RAJEEV, Sreekumari. Whole Genome Sequencing Allows Better Understanding of the Evolutionary History of Leptospira interrogans Serovar Hardjo. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.1-12, 21 jul. 2016. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159387>.

LO, Miranda et al. Comparative Transcriptional and Translational Analysis of Leptospiral Outer Membrane Protein Expression in Response to Temperature. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 12, p.1-12, 8 dez. 2009. Public Library of Science (PLOS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000560>.

LOFFLER, Sylvia Grune et al. Genotypes of pathogenic Leptospira spp isolated from rodents in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 109, n. 2, p.163-167, fev. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140295>.

LOURDAULT, Kristel et al. Inactivation of clpB in the Pathogen *Leptospira interrogans* Reduces Virulence and Resistance to Stress Conditions. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 79, n. 9, p.3711-3717, 5 jul. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.05168-11>.

MANN, Martin; WRIGHT, Patrick R.; BACKOFEN, Rolf. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA–RNA interactions. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.435-439, 4 maio 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx279>.

MATSUNAGA, James et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 4, p.929-946, 4 jul. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x>.

MCBRIDE, Alan J.a. et al. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.196-205, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2008.10.012>.

MEKALANOS, J. J.. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. **Journal Of Bacteriology**, [s. L.], v. 174, n. 1, p.1-7, jan. 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências.. **Saúde Legis - Sistema de Legislação da Saúde**. Distrito Federal, Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html>. Acesso em: 15 out. 2018.

MORENO, Luisa Z et al. Comparative genomics of pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from swine and human in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.],

v. 113, n. 2, p.126-129, fev. 2018. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170119>.

MORGAN, Juliette et al. Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 34, n. 12, p.1593-1599, 15 jun. 2002. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1086/340615>.

NALAM, Kishore. **Leptospira spp. MLST Databases**. 2018. Disponível em:
<https://pubmlst.org/leptospira/>. Acesso em: 25 out. 2018.

NALAM, Kishore et al. Genetic Affinities within a Large Global Collection of Pathogenic Leptospira: Implications for Strain Identification and Molecular Epidemiology. **Plos One**, [s.l.], v. 5, n. 8, p.1-8, 27 ago. 2010. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012637>.

NALLY, Jarlath E. et al. Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe Pulmonary Leptospirosis. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 164, n. 3, p.1115-1127, mar. 2004. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63198-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63198-7).

NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative Genomics of Two Leptospira interrogans Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 186, n. 7, p.2164-2172, 17 mar. 2004. American Society for Microbiology.

PALANIAPPAN, Raghavan Um; RAMANUJAM, Subbupoongothai; CHANG, Yung-fu. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion In Infectious Diseases**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.284-292, jun. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
<http://dx.doi.org/10.1097/qco.0b013e32814a5729>.

PALANIAPPAN, R. U. M. et al. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against Leptospira interrogans Serovar Pomona Infection.

Infection And Immunity, [s.l.], v. 74, n. 3, p.1745-1750, 22 fev. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.74.3.1745-1750.2006>.

PASTER, Bruce J.; DEWHIRST, Floyd E.. Phylogenetic Foundation of Spirochetes. **Jmmb Symposium On Spirochete Physiology**, [S. I.], v. 2, n. 4, p.341-344, out. 2000.

PASTER, Bruce J.. Spirochaetales. In: WHITMAN, William Barnaby et al. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 2. ed. New Jersey, Usa: Hoboken, New Jersey, 2015. p. 1-3. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118960608.obm00105>. Acesso em: 14 nov. 2018.

PASTER, B. J. et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. **Journal Of Bacteriology**. Massachusetts, p. 6101-6109. out. 1991. Disponível em: <http://jb.asm.org/content/173/19/6101.short>. Acesso em: 10 jan. 2018.

PAPPAS, Christopher J.; BENAROUDJ, Nadia; PICARDEAU, Mathieu. A Replicative Plasmid Vector Allows Efficient Complementation of Pathogenic Leptospira Strains. **Applied And Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 81, n. 9, p.3176-3181, 27 fev. 2015. American Society for Microbiology.

PATTI, J M et al. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.585-617, out. 1994. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003101>.

PEARL, Laurence H.; PRODROMOU, Chrisostomos. Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. **Annual Review Of Biochemistry**, [s.l.], v. 75, n. 1, p.271-294, jun. 2006. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142738>.

PEÑA-MOCTEZUMA, Alejandro; BULACH, Dieter M; ADLER, Ben. Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.73-81, jul. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2001.tb01589.x>.

PICARDEAU, Mathieu et al. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. **Plos One**, [S. l.], v. 3, n. 2, p.1-9, 13 fev. 2008. Public Library of Science (PLoS).

PICARDEAU, Mathieu. *Leptospira*. **Bergey's Manual Of Systematics Of Archaea And Bacteria**, [s.l.], p.1-18, 15 dez. 2017. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01244.pub2>

PFAFFL, M. W.. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.2002-2007, 1 maio 2001. Oxford University Press (OUP).

REN, Shuang-xi et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, [s.l.], v. 422, n. 6934, p.888-893, abr. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01597>.

RICKLIN, Daniel et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.785-797, 19 ago. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1923>.

ROMERO, Klicte Calo et al. SEARCH FOR AGGLUTINATING ANTIBODIES TO *Leptospira* AND *Uptonem a* IN HORSES, SAO PAULO, BRAZIL. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 31, n. 3, p.210-215, maio 1994.

SAIER, Milton H. et al. The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.372-379, 5 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1103>.

SAKOLVAREE, Yuwaporn et al. Proteome and Immunome of Pathogenic *Leptospira* spp. Revealed by 2DE and 2DE-Immunoblotting with Immune Serum. **Asian Pacific Journal Of Allergy And Immunology** (, [s. L.], v. 25, p.53-7, 2007.

SANTOS, Luciane Amorim. LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROVAR COPENHAGENI E ICTEROHAEMORRHAGIAE: RELAÇÃO EVOLUTIVA, DIFERENÇAS GENÉTICAS E ASSOCIAÇÃO COM DESFECHO CLÍNICO. 2015. 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2015.

SARKISOVA, S. et al. Calcium-Induced Virulence Factors Associated with the Extracellular Matrix of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 187, n. 13, p.4327-4337, 20 jun. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.187.13.4327-4337.2005>.

SATOU, Kazuhito et al. Complete Genome Sequences of Low-Passage Virulent and High-Passage Avirulent Variants of Pathogenic *Leptospira interrogans* Serovar Manilae Strain UP-MMC-NIID, Originally Isolated from a Patient with Severe Leptospirosis, Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology: TABLE 1. **Genome Announcements**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.1-2, 13 ago. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00882-15>.

SILVA, Ludmila Bezerra da. **Identificação de Proteases de Leptospiras Envolvidas na Degradação de Proteínas da Matriz Extracelular e do Plasma Humano**. 2017. 66 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SODEINDE, O. et al. A surface protease and the invasive character of plague. **Science**, [s.l.], v. 258, n. 5084, p.1004-1007, 6 nov. 1992. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1439793>.

SØNDERGAARD, Mads Madsen et al. Leptospirosis-Associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome with Lower Back Pain as an Initial Symptom. **American Journal Of Case Reports**, [s.l.], v. 17, p.883-886, 24 nov. 2016. International Scientific Information, Inc.. <http://dx.doi.org/10.12659/ajcr.900477>.

STORK, M. et al. Transcription Termination within the Iron Transport-Biosynthesis Operon of *Vibrio anguillarum* Requires an Antisense RNA. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 189, n. 9, p.3479-3488, 2 mar. 2007. American Society for Microbiology.

STORZ, Gisela; ALTUVIA, Shoshy; WASSARMAN, Karen M.. An Abundance of RNA Regulators. **Annual Review Of Biochemistry**, [S. l.], v. 74, n. 1, p.199-217, jun. 2005. Annual Reviews.

STRAUSS, Evelyn J.; FALKOW, Stanley. Microbial Pathogenesis: Genomics and Beyond. **Science**, [S. l.], v. 276, p.707-712, 2 maio 1997. Mensal.

TAN, Joon et al. A phylogenomic approach to bacterial subspecies classification: proof of concept in *Mycobacterium abscessus*. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-3, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-879>.

TROWBRIDGE, Arthur A. et al. Hemolytic Anemia Associated with Leptospirosis. Morphologic and Lipid Studies. **American Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 76, n. 4, p.493-498, 1 out. 1981. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/76.4.493>.

VARNI, Vanina et al. Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 22, p.216-222, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.002>.

VERMA, A. et al. Leptospiral Endostatin-Like Protein A Is a Bacterial Cell Surface Receptor for Human Plasminogen. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 78, n. 5, p.2053-2059, 16 fev. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01282-09>.

VIJAYACHARI, P et al. Immunogenicity of a novel enhanced consensus DNA vaccine encoding the leptospiral protein LipL45. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.1945-1953, 28 maio 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1047117>.

WATERS, Lauren S.; STORZ, Gisela. Regulatory RNAs in Bacteria. **Cell**, [S. l.], v. 136, n. 4, p.615-628, fev. 2009. Elsevier BV.

WILSON, T. S.. Recent observations on leptospirosis in Northern Ireland and their bearing on current diagnostic methods. **Journal Of Clinical Pathology. Belfast**, p. 415-423. set. 1966. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC473342/>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

WOESE, Carl R.. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, [s. L.], v. 51, n. 2, p.221-271, jun. 1987.

YANAGIHARA, Yasutake et al. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. **Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases**, [s.l.], v. 30, n. 5-6, p.399-413, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2007.05.003>.

YANG, Jianyi et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.7-8, jan. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3213>.

ZENG, Ling-bing et al. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulence determinants. **Journal Of Proteomics**, [s.l.], v. 112, p.27-37, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.015>.

ZHANG, Lei et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 83, n. 5, p.1006-1023, 14 fev. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07985.x>.

ZHONG, Yi et al. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601. **Cell Research**, [s.l.], v. 21, n. 8, p.1210-1229, 22 mar. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.46>.

ZHU, Ying et al. *Leishmania major* CorA-like magnesium transporters play a critical role in parasite development and virulence. **International Journal For Parasitology**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.713-723, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.11.010>.

ZHUKOVA, Anna et al. Genome-Wide Transcriptional Start Site Mapping and sRNA Identification in the Pathogen *Leptospira interrogans*. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 7, p.1-14, 19 jan. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2017.00010>.

ZUKER, M.. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 31, n. 13, p.3406-3415, 1 jul. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg595>.